

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacina en
bovinos de diferentes edades y relación PK-PD frente a mastitis
estafilocócicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego Carlos Díaz David

Directores

**Manuel I. de San Andrés Larrea
Samanta Waxman
Juan Carlos Boggio**

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacina en bovinos de diferentes edades y relación PK/PD frente a mastitis estafilocócicas.

Diego Carlos Diaz David

Madrid, 2011

D. Manuel Ignacio de San Andrés Larrea, Profesor Titular de Farmacología, adscrito al Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Dña. Samanta Waxman, Profesora de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (República Argentina) y D. Juan Carlos Boggio, Profesor Titular de Farmacología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba (República Argentina)

CERTIFICAN

Que la memoria presentada por el Veterinario D. Diego Carlos Diaz David, con el título “Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en bovinos de diferentes edades y relación PK/PD frente a mastitis estafilocócicas”, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio del Dpto. de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y en los campos de prácticas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (República Argentina).

Madrid, octubre de 2011

Fdo. Manuel I. de San Andrés Larrea Fdo. Samanta Waxman Fdo. Juan Carlos Boggio

Trabajo que presenta D. Diego Carlos Diaz David
para aspirar al título de Doctor

Fdo. Diego Carlos Diaz David

Madrid, octubre 2011

AGRADECIMIENTOS

No es tarea fácil comenzar estas líneas, considerando que con ellas estoy culminando un sueño muy importante en mi vida, sueño que pareciera comenzó ayer, aunque en realidad ha sido un largo viaje.

Estos agradecimientos son solo un pequeño reconocimiento para quienes en mayor o menor medida han sido mis apoyos en este sueño; trataré de no olvidar a ninguno.

Agradezco en primer lugar a mi Señor y Salvador, Jesucristo de Nazareth, quien llegó a mi vida para darme una esperanza nueva, un horizonte repleto de promesas y una Fe que es el motor de mi vida desde entonces. Gracias por permitirme conocerte.

En marzo de 2001, cuando escribí unos párrafos de agradecimiento para mi tesis de Magíster, solo dediqué unas palabras a dos personas que conocía desde hacía muy poquito tiempo. Hoy, diez años después, quiero darle gracias a quien desde hace seis años es mi amada esposa: Silvina. Cuesta creer todo lo que hemos compartido desde entonces, le doy gracias a Dios por haberte puesto en mi camino y espero compartir toda mi vida con vos.

Gracias Nicolás, porque fuiste quien me enseñó a ser padre, siendo mi “conejillo de indias” en este difícil pero hermoso aprendizaje.

Gracias Candela y Jeremías, pequeños retoños que surgieron de una raíz fuerte: el amor entre papá y mamá.

Gracias familia, los amo con todo mi corazón.

A mis padres, Juan Carlos y Sara. Fueron quienes marcaron en mi vida una forma de vivir, una conducta, y por sobre todo, me dieron un futuro. Gracias.

A mi hermana Carina, Juan y Lucía.

A quienes me ayudaron a salir adelante en momentos difíciles, y me ayudaron a caminar por el camino de la Fe, sin el cual hoy no estaría finalizando esta Tesis: Néstor, Pastor Quique y Sra. Adriana.

A Manolo, quien no fue solo mi Director de tesis, porque ese título le quedaría escaso. Fue mi ayuda, mi estímulo, mi ejemplo, mi amigo, una persona para quien los imposibles no existen. Como no creo en el azar, sé que Dios te ha puesto en mi camino y por ello le agradezco a El y a vos con todo mi corazón por lo que has hecho por mí.

A Sonia, por su inestimable colaboración en los análisis de muestras y también por tu hospitalidad cuando anduve por allí.

A Juan Carlos, artífice de gran parte de lo que he logrado en mi carrera y en mi vida personal, quien me impulsó a confiar en mi mismo, a avanzar en la vida, quien abrió puertas para que yo entrara. Esa misma confianza, ese mismo empuje es el que te sacaré de este momento difícil, pero pasajero. Con la ayuda del Señor confío en que será así. Gracias por todo, como siempre decís. Este es un logro que te pertenece.

A Samanta, por el entusiasmo que siempre me transmitiste, por tu constante disposición a colaborar conmigo para que esto salga a la luz. Fuiste de inestimable ayuda.

A Julio de Lucas, sin tu ayuda no hubiese podido analizar las muestras, gracias por tu tiempo y tu dedicación.

A Casilda, Mariló, Teresa y todos los integrantes de Farmacología en la Complutense. Me han hecho sentir siempre como en casa, gracias por su amistad.

A los colegas de la cátedra en Argentina, Eduardo Picco, Héctor, Dr. Rubio, Eduardo Baroni y Enrique. Parte de esta conquista es también de ustedes.

A los Allignani, Edgardo, quien ya no nos acompaña pero permanecerá siempre en mi recuerdo, a Rogelio, Mario y Cristóbal. Gracias por el apoyo incondicional a mi formación.

A quienes facilitaron desinteresadamente los animales e instalaciones para los ensayos, Alberto Sureda e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

A Norma Russi, gracias por tu indispensable colaboración para la realización de los ensayos microbiológicos.

A quienes colaboraron en los ensayos, pasantes y ayudantes de la cátedra de farmacología, a Luis Calvino y personal de apoyo del INTA.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, mi segundo hogar, y sus autoridades. Gracias por el apoyo institucional y financiero. Es mi misión ahora devolver lo mucho que han depositado en mi formación profesional.

A quienes quizá olvidé mencionar, GRACIAS A TODOS!.

Al Señor por darme vida.

A Silvina por su amor.

A Nicolás, Candela y Jeremías.

INDICE

	Página
I – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
Farmacología de quinolonas. Marbofloxacin	3
I-1-Generalidades	3
I-1-1-Evolución histórica y clasificación	3
I-1-2-Estructura química: Relación estructura-actividad	9
I-1-3-Propiedades físico-químicas	13
I-1-4-Mecanismo de acción	16
I-1-5-Propiedades <i>in vitro</i>	22
I-1-5-1-Espectro de actividad de las fluoroquinolonas	23
I-1-5-2-Actividad <i>in vitro</i> de la marbofloxacin	27
I-1-6-Efecto post antibiótico	28
I-1-7-Integración farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)	30
I-1-8-Indicaciones terapéuticas en rumiantes	34
I-1-9-Resistencias bacterianas	37
I-1-10-Toxicidad	46
I-1-11-Interacciones	51
I-2-Farmacocinética de quinolonas	53
I-2-1-Farmacocinética de quinolonas en rumiantes	62
I-2-2-Farmacocinética de marbofloxacin	64
I-2-3-Factores que pueden modificar la farmacocinética de las quinolonas.	68
II- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	89
III- MATERIALES Y MÉTODOS	95
III-1- Materiales	97
III-2-Métodos	101
III-2-1-Alojamiento y alimentación de los animales	101
III-2-2-Administración del fármaco	102
III-2-3-Toma de muestras	103
III-2-4-Acondicionamiento de las muestras	107
III-2-5-Técnica extractiva	107
III-2-6-Metodología analítica	109
III-2-7-Tratamiento cinético	113
III-2-8-Tratamiento estadístico	114
III-2-9-Determinación de concentración inhibitoria mínima y cálculo de parámetros PK/PD.	115
III-2-9-1-Aislamiento e identificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	115
III-2-9-2-Prueba de concentración inhibitoria mínima por dilución en agar.	115

IV- RESULTADOS	119
IV-1-Examen clínico y analítica sanguínea de los animales	121
IV-2-Metodología analítica	121
IV-3-Tratamiento cinético	127
IV-3-1-Administración intravenosa en terneras neonatas	127
IV-3-2-Administración oral en terneras neonatas	129
IV-3-3-Administración intravenosa en terneras de 10 días de vida.	131
IV-3-4-Administración oral en terneras de 10 días de vida.	134
IV-3-5-Administración intravenosa en terneras de 50 días de vida.	136
IV-3-6-Administración oral en terneras de 50 días de vida. Dosis de 2 mg/kg	139
IV-3-7-Administración oral en terneras de 50 días de vida. Dosis de 5 mg/kg	141
IV-3-8-Administración intravenosa en vacas.	143
IV-3-9-Administración intramuscular en vacas.	147
IV-3-10-Administración intramamaria en vacas.	151
IV-4-Tratamiento estadístico.	156
IV-5-Determinación de concentración inhibitoria mínima para <i>S. aureus</i> y cálculo de parámetros indicadores de eficacia antimicrobiana.	157
V- DISCUSIÓN	159
V-1-Material	161
V-2-Métodos	165
V-2-1-Protocolos de administración del fármaco, obtención y acondicionamiento de las muestras.	165
V-2-2-Metodología analítica.	167
V-2-3-Tratamiento farmacocinético y estadístico.	170
V-3-Farmacocinética de marbofloxacin por vía intravenosa.	170
V-4-Farmacocinética de marbofloxacin por vía oral.	177
V-5-Farmacocinética de marbofloxacin por vía intramuscular en vacas.	181
V-6- Cinética láctea de marbofloxacin.	184
V-7-Determinación de CIM de <i>S.aureus</i> y parámetros indicadores de eficacia antimicrobiana.	189
VI-CONCLUSIONES	195
VII-RESUMENES	201
VII-1-Resumen en español.	203
VII-2-Summary.	206
VIII-BIBLIOGRAFÍA	209
IX-ANEXOS	251

I – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: FARMACOLOGÍA DE QUINOLONAS. MARBOFLOXACINA

I.1. GENERALIDADES

I.1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN

La terapia antimicrobiana comenzó con el descubrimiento de las sulfamidas en la década de 1930 (Mitscher y col, 1989). Durante las siguientes décadas, cambios en los tipos de infección, así como en la sensibilidad bacteriana a los agentes antimicrobianos han estimulado una búsqueda continua de alternativas terapéuticas que amplíen el espectro y la actividad. Así, en los años cuarenta se descubrió la penicilina, y posteriormente el cloranfenicol, la eritromicina, la tetraciclina y la vancomicina en la siguiente década. En los años sesenta aparecieron las penicilinas antiestafilocócicas y las cefalosporinas en respuesta al aumento en las frecuencias de aparición de estafilococos penicilino-resistentes e infecciones nosocomiales a gram negativos.

Ya en 1949, Price había descubierto un derivado alcaloide con una estructura quinolónica y sin actividad biológica. En 1960, Barton patentó ochenta compuestos antimicrobianos con estructura quinolónica (Bryskier y Chantot, 1995) y en 1962, Leshner y col. descubrieron, durante la síntesis del compuesto contra la malaria cloroquina, un derivado con actividad antibacteriana: el ácido nalidíxico (Leshner y col., 1962). Esta nueva molécula, aprobada para uso clínico en 1965, era adecuada para el tratamiento de infecciones entéricas y del tracto urinario causadas por bacterias gram negativas. Sin embargo, el uso del ácido nalidíxico en el tratamiento de infecciones sistémicas no resultó una alternativa terapéutica debido a las moderadas concentraciones séricas y tisulares alcanzadas, y a las elevadas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) requeridas (Mitscher y col., 1989).

Dada la relativa simplicidad molecular y la buena actividad contra gérmenes gram negativos que poseía el ácido nalidíxico, se buscó sintetizar compuestos similares que mejoraran sus características farmacológicas. Un avance en el desarrollo de estos compuestos sobrevino con el descubrimiento de dos derivados: el ácido pipemidínico y la flumequina. El ácido pipemidínico contiene un anillo 7-piperazinil y la misma actividad antibacteriana que el ácido nalidíxico, aunque es parcialmente activo contra algunos patógenos resistentes al mismo. La flumequina se caracteriza por un átomo de flúor en posición 9, que la hace 10 veces más activa contra gram negativos que el ácido nalidíxico. Así, durante la década siguiente se introdujeron en la clínica las llamadas "quinolonas clásicas" o quinolonas de primera generación, que incluían al ácido pipemidínico, la flumequina, la cinoxacina, la rosoxacina, los ácidos piromídico y oxolínico. Estos nuevos agentes eran activos, principalmente, contra bacterias gram negativas, pero no tenían acción contra pseudomonas, gram positivos, micobacterias, ureaplasmas, clamidias o anaerobios y poseían solo ventajas marginales sobre el ácido nalidíxico.

El progreso en el desarrollo de las quinolonas sobrevino en la década del ochenta con la introducción de un átomo de flúor en el núcleo básico de la molécula, en posición C6 y un sustituyente piperazínico o pirrolidínico en posición C7. Así, las nuevas fluoroquinolonas, como la norfloxacin (la primera quinolona aprobada para uso clínico), mostraron un aumento en su actividad antibacteriana contra bacterias gram negativas y gram positivas, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos (Norris y Mandell, 1988; Fitton, 1992; Martínez y col., 2006), contra patógenos intracelulares (Barry, 1989; El Bahri y Blouin, 1991; Lecoœur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998) y contra algunos micoplasmas (Vancutsem y col., 1990; Brown, 1996). También la tasa de absorción oral y distribución tisular fueron mejoradas en estas nuevas moléculas (Ball, 2000). Norfloxacin fue patentada en 1978, y en los siguientes tres años aparecieron diversas moléculas, algunas de ellas de uso actual, como pefloxacin (patentada en 1979), enoxacin (1980), fleroxacin

(1981), ciprofloxacina (1981) y ofloxacina (1982) (Appelbaum & Hunter, 2000). La primera fluoroquinolona aprobada para uso en Medicina Veterinaria fue enrofloxacin, en la década de 1980 (Martínez y col., 2006)

En la literatura se describen numerosas clasificaciones de las quinolonas, aunque en general se hace referencia a la “generación” a la que pertenecen, si bien este agrupamiento se basa en diferentes conceptos. Fitton (1992) describe una división de acuerdo a la presencia de átomos de flúor, y sostiene que la primera generación estaría formada por las quinolonas clásicas, no fluoradas (ácidos nalidíxico, oxolínico, pipemídico y cinoxacin), la segunda, originada a partir de la síntesis de la norfloxacina, estaría compuesta por quinolonas monofluoradas, como la ciprofloxacina, enoxacin, ofloxacina, pefloxacina, amifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y marbofloxacina y una tercera generación estaría integrada por los compuestos multifluorados, como la fleroxacin, lomefloxacina, danofloxacina, tosufloxacina, temafloxacina, difloxacina, sparfloxacina o trovafloxacina.

Otra forma en que se clasifica a las quinolonas en generaciones es en función del espectro que abarquen y sus propiedades farmacocinéticas. Así, la primera generación estaría formada por las quinolonas clásicas, moléculas caracterizadas por biodisponibilidad oral pobre, limitada distribución tisular y espectro limitado a *Escherichia coli* y otros Gram negativos. La segunda generación la integran las primeras fluoroquinolonas y otras más recientes (ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina, danofloxacina, difloxacina y marbofloxacina), caracterizándose por mayor biodisponibilidad oral y distribución tisular, así como actividad antimicrobiana aumentada hacia enterobacterias y otros Gram negativos (incluyendo *P. aeruginosa*) y también cocos Gram positivos (Martínez y col., 2006). La tercera generación (levofloxacina, sparfloxacina, grepafloxacina, orbifloxacina) estaría compuesta por fluoroquinolonas que mantienen las propiedades de la segunda, pero que presentan mayor potencia *in vitro* contra gram negativos, gram positivos, anaerobios y micobacterias, esto sumado a excelente disponibilidad oral y

prolongada semivida de eliminación, así como menor toxicidad sobre el

sistema nervioso central e inferiores interacciones con el citocromo P450 (Ball, 2000). Por último, la cuarta generación la componen quinolonas de reciente aparición como trovafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, gemifloxacin y sitafloxacin (Owens y Ambrose, 2002).

También existe una clasificación basada en la estructura química que las divide, de acuerdo al núcleo básico que posean, en naftiridinas (ácido nalidíxico, enoxacin), cinolinas (cinoxacin), pirido-pirimidinas (ácido pipemidínico y ácido piromídico) y quinolonas (flumequina, acrosoxacin, ácido oxolínico y las fluoroquinolonas).

Por su parte, Bryskier y Chantot (1995) proponen dos sistemas de clasificación, basados en la estructura química y en las propiedades biológicas, respectivamente. Según esta clasificación, se pueden diferenciar cuatro grupos de quinolonas, de acuerdo a la estructura química, en función del núcleo básico que posean: monocíclico, bicíclico, tricíclico y tetracíclico. Esta clasificación se ilustra en la figura I.1.

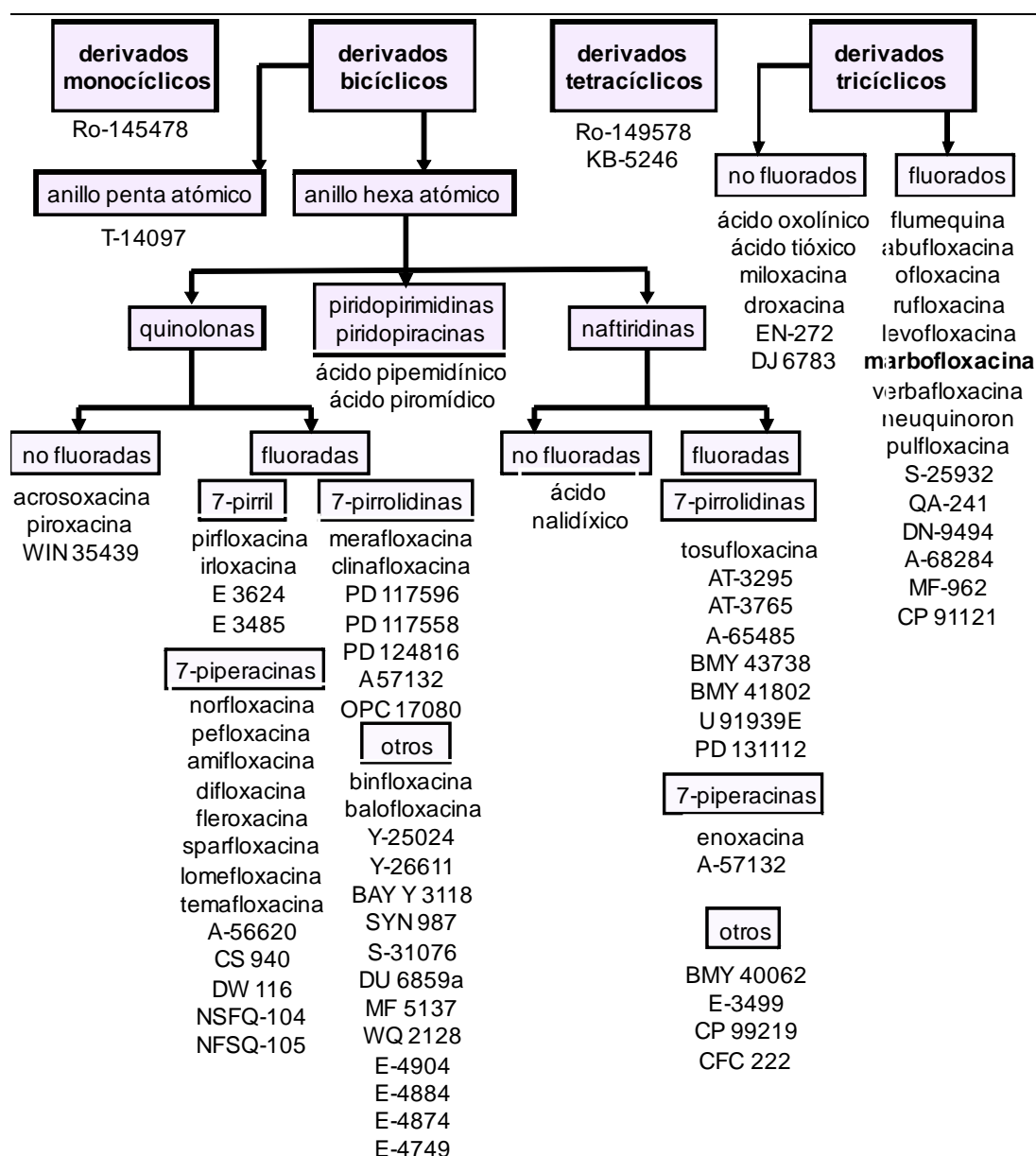


Figura I.1. Clasificación de las quinolonas según su estructura química (Bryskier y Chantot, 1995).

De acuerdo a la actividad biológica, estos mismos autores dividen a estos compuestos en cuatro grupos, en función de su espectro antibacteriano y del grado de transformación metabólica que sufran. De esta manera, un primer grupo estaría formado por las quinolonas con espectro limitado (aquellas activas contra enterobacterias, como las quinolonas clásicas) y un segundo grupo incluiría a aquellas con espectro ampliado. En este último grupo se encontrarían las quinolonas más nuevas, que poseen, además,

perfiles farmacocinéticos más favorables y concentraciones inhibitorias mínimas menores. Cada uno de estos grupos se dividiría a su vez en dos, en función del grado de metabolismo, para lo cual consideran que una molécula no es significativamente metabolizada cuando menos del 5 % de la dosis es detectada en forma de metabolitos. La figura I.2. resume esta clasificación.

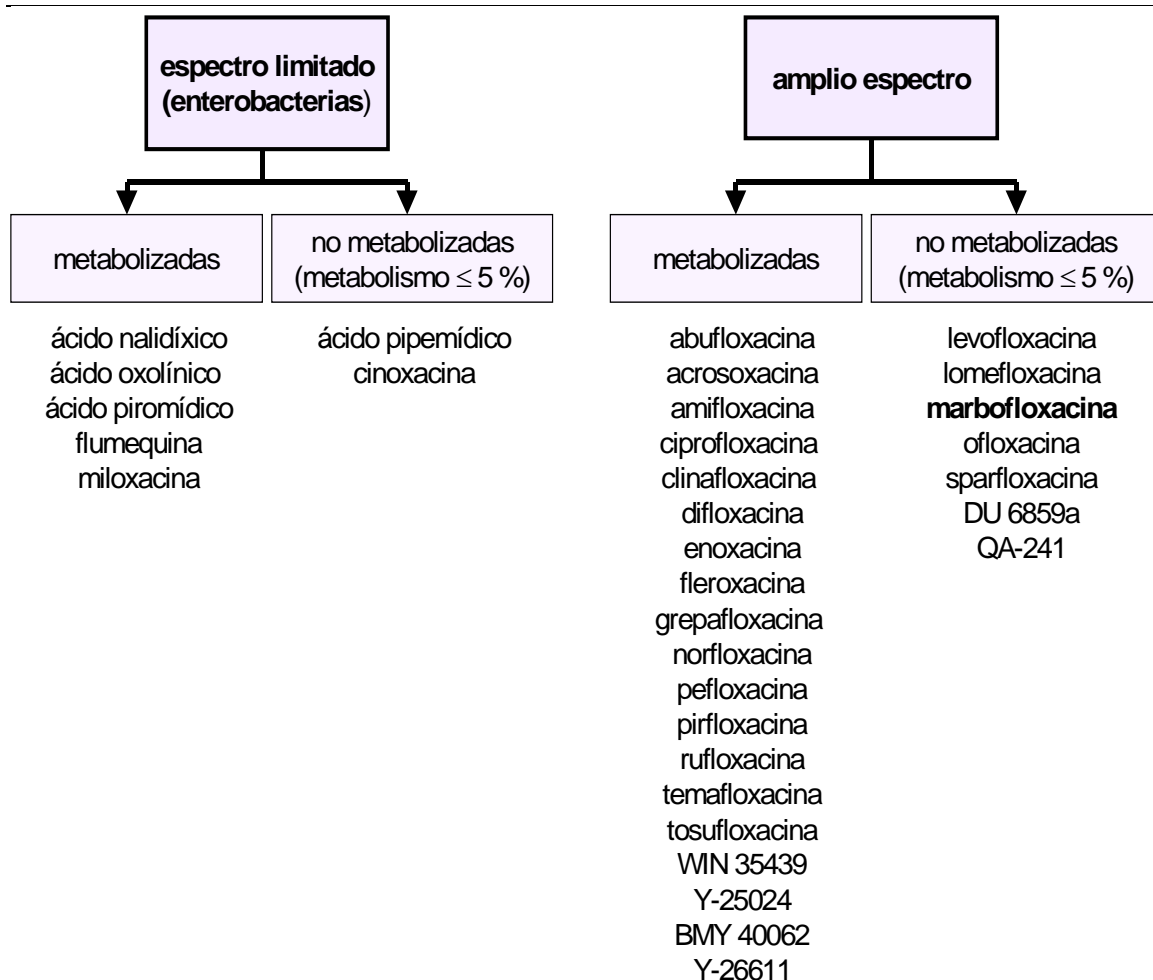


Figura I.2. Clasificación de las quinolonas según la actividad biológica (Bryskier y Chantot, 1995)

Las principales quinolonas aprobadas para uso en Medicina Veterinaria en diversos países son el ácido oxolínico, la danofloxacina, la difloxacina, la enrofloxacina, la flumequina, la marbofloxacina, la norfloxacina y nicotinato de norfloxacina, la ofloxacina, la orbifloxacina y la sarafloxacina.

I.1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA: RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.

El ácido nalidíxico (ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3- carboxílico) fue sintetizado después de descubrir que la 7-cloroquinolina (ácido 7-cloro-1,4-dihidro-1-etil-4-oxo-quinolina-3-carboxílico), obtenida durante la purificación de la cloroquina, poseía actividad antibacteriana. Sin embargo, a diferencia de esta última, el ácido nalidíxico no es halogenado. Luego del descubrimiento del ácido nalidíxico, los químicos comenzaron a realizar cambios en las distintas posiciones de la molécula, a los fines de aumentar su potencia, ampliar su espectro antibacteriano y disminuir los efectos colaterales (Martínez y col., 2006)

La estructura básica de las quinolonas consiste en un núcleo aromático heterocíclico, un grupo ácido carboxílico y un grupo cetona en posición para al nitrógeno heterocíclico. En el caso del ácido nalidíxico, el núcleo básico es el anillo naftiridina, con dos átomos de nitrógeno en el núcleo básico. Otras estructuras similares a este anillo son el núcleo cinolina, que da origen a la cinoxacina y las pirido-pirimidinas, como el ácido pipemidínico y el ácido piromidínico. El resto de las quinolonas tienen como base al núcleo quinolónico (figura I.3.) (Smith y Lewin, 1988).

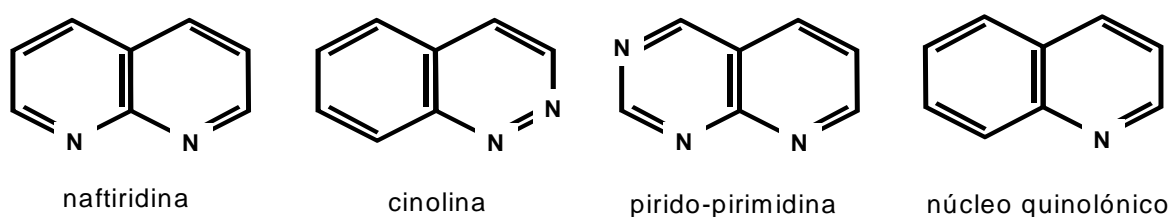


Figura I.3. Estructuras básicas de las quinolonas.

La actividad antibacteriana de las quinolonas depende, no solamente de la naturaleza del núcleo básico, sino también de los sustituyentes periféricos del mismo y de su relación espacial (Bryskier y Chantot. 1995). El anillo quinolónico puede sufrir sustituciones en diversas posiciones, que llevan a

variaciones en la afinidad por las enzimas bacterianas, la penetración celular, el espectro antibacteriano y las características farmacocinéticas de las distintas moléculas. Para exhibir actividad antibacteriana, los requisitos mínimos de la estructura química son los siguientes: el doble enlace entre las posiciones 2-3 no debe estar reducido y un grupo cetona libre debe estar presente en posición 4 (Bryskier y Chantot, 1995). En la figura 1.4. se resumen las posibles modificaciones estructurales del núcleo y sus efectos sobre las características del fármaco (Boswell y Wise, 1998).

Los sustituyentes en N1 modifican la potencia y tienen efecto sobre la farmacocinética del compuesto (biodisponibilidad oral, penetración tisular, semivida de eliminación prolongada), siendo los más comunes los grupos etilo, ciclopropilo y 2,4-difluorofenilo.

En C2 los sustituyentes deben ser anillos pequeños por la proximidad al sitio de unión de la enzima.

La presencia del ácido carboxílico en C3 y del radical carbonilo en C4 son esenciales para la unión a la girasa y el transporte en la bacteria.

La sustitución con un grupo amino en C5 ha demostrado ser óptima, ya que mejora la potencia a la vez que amplía la actividad contra gram negativos. La contribución del sustituyente C5 a la actividad antibacteriana aumenta en el siguiente orden: $\text{OH} \leq \text{F} \leq \text{Cl} \leq \text{OCH}_3 < \text{NH} < \text{CH}_3$ (Bryskier y Chantot, 1995). Sin embargo, sus efectos dependen de la sustitución en N1. En caso de ser el sustituyente N1 un grupo ciclopropilo, se amplía la actividad tanto contra gram positivos como gram negativos. Esto es a su vez dependiente de la sustitución en C8, mejorando cuando este último sustituyente es un radical haluro (F).

Un átomo de flúor (F) en C6 (fluoroquinolonas), en combinación con un grupo aminocíclico en C7, proveen un amplio espectro de actividad (el flúor en C6 amplía el espectro abarcando, incluso, algunos gram positivos y un anillo

piperacínico en C7 hace a la molécula activa contra pseudomonas) y mejoran tanto la acción sobre la girasa como la penetración en la célula bacteriana (Mitscher y col., 1989; Percival, 1991; Boswell y Wise, 1998). Además, la adición de cadenas alquiladas en posición "para" del anillo piperacínico, aumenta la liposolubilidad y, consecuentemente, el volumen de distribución de los compuestos (al igual que pasa en N1) (Vancutsem y col., 1990).

El primer compuesto con un átomo de fluor en C-6 fue la flumequina, patentada en 1973, mientras que norfloxacin, patentada en 1978, fue la primera molécula que combinó una cadena piperacínica en posición 7 y un átomo de flúor en posición 6 (Martínez y col., 2006).

El sustituyente R₇ influye, en gran medida, en la potencia, el espectro y la farmacocinética de la molécula, siendo la mayoría diaminas monocíclicas. Los sustituyentes bicíclicos aportan mayor actividad contra gram positivos que contra gram negativos. Los sustituyentes C7 alquilados disminuyen la producción de efectos adversos, como el riesgo de cristaluria, debido a que aumentan la hidrosolubilidad del compuesto a pH fisiológico (Bryskier y Chantot, 1995; Boswell y Wise, 1998).

Si la posición 8 está ocupada por un átomo de nitrógeno (N), el compuesto es realmente una naftiridona, y si está ocupada por un átomo de carbono, el compuesto es una quinolona. Las naftiridonas poseen mejores características farmacocinéticas, como una mayor semivida de eliminación y mayor área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo que la quinolona equivalente (Boswell y Wise, 1998). Si el átomo de hidrógeno en C8 se sustituye por un átomo de flúor, se produce un aumento significativo de la actividad biológica (Vancutsem y col., 1990). La adición de un átomo de flúor o de cloro en C8 mejora la absorción oral del compuesto, siendo el orden en que los distintos sustituyentes incrementan esta absorción oral de las quinolonas C-F, C-L > N > C-OCH₃ > CH (Bryskier y Chantot, 1995). Todas las quinolonas que se utilizan clínicamente hoy en día están halogenadas en la posición-6, y algunas también lo están en la posición-8.

Las modificaciones estructurales pueden también afectar la interacción

de la fluoroquinolona con cationes divalentes. Cuando existen pocas substituciones en el núcleo quinolona o el grupo piperacínico (ej. Norfloxacin, ciprofloxacina), existe amplia reducción en la biodisponibilidad en presencia de dichos cationes (Martínez y col., 2006).

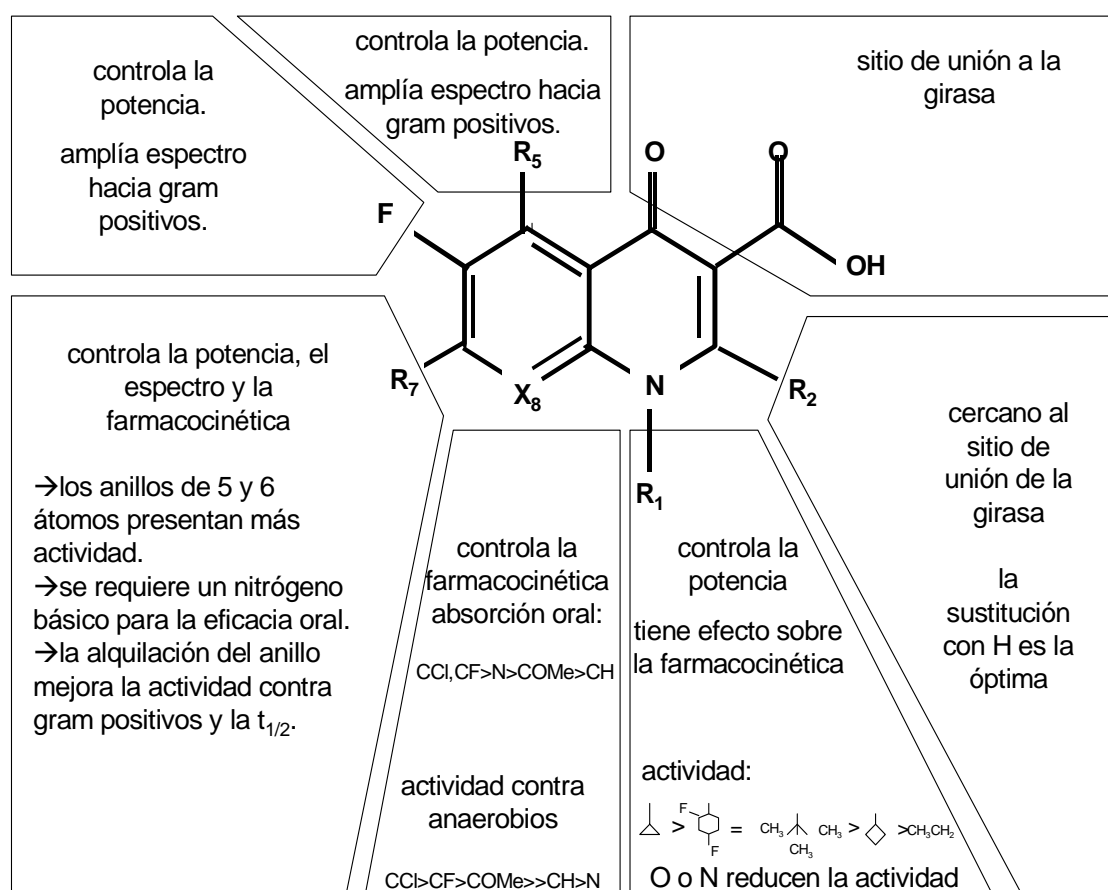


Figura I.4. Modificaciones del núcleo básico de las quinolonas (Boswell y Wise, 1998).

De acuerdo con estas posibles modificaciones en la estructura química, el desarrollo de las quinolonas parece haber evolucionado en dos direcciones: una hacia compuestos con mejoras en las características farmacocinéticas (mayores niveles plasmáticos y tisulares, mayor semivida de eliminación) y la otra hacia compuestos con mayor actividad antimicrobiana. Ejemplos del primer grupo son la ofloxacina, fleroxacina o lomefloxacina, y del segundo, la ciprofloxacina.

En el caso de la marbofloxacin (figura 1.5.), el incremento de la

potencia por la sustitución con un átomo de flúor en C6, se acompaña de la introducción de un anillo piperacínico (N-metil piperacina) en C10 y un átomo de oxígeno en posición 1, que da origen a un ciclo oxadiacínico. El ciclo piperacínico mejora la formación del complejo ADN-ADN girasa así como la penetración en la célula bacteriana. La adición del grupo metilo en posición "para" del anillo piperacínico aumenta la liposolubilidad del fármaco y, con ello, el volumen de distribución. El anillo oxadiacínico confiere a la molécula características farmacocinéticas como prolongada semivida de eliminación y buena biodisponibilidad a la vez que aumenta el espectro frente a bacterias gram positivas y anaerobios. Además, el núcleo tricíclico confiere mayor estabilidad metabólica al compuesto (Neuman, 1987).

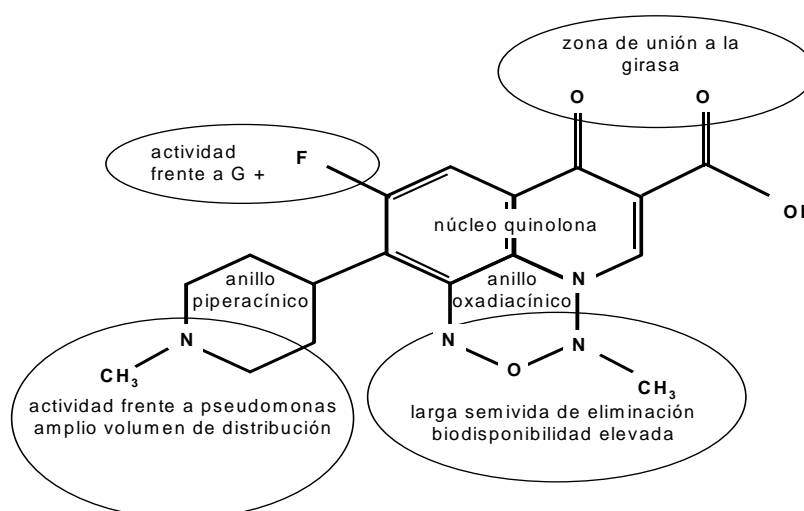


Figura I.5. Estructura química de la marbofloxacina.

I.1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Las quinolonas tienen dos grupos funcionales ionizables farmacéuticamente relevantes: el ácido carboxílico y un nitrógeno protonable. Esta asociación, que le confiere a estos compuestos propiedades anfotéricas, tiene un importante efecto en la solubilidad y el coeficiente de partición. Las quinolonas pueden existir en cuatro formas distintas a medida que varía el pH de la solución: un catión (H_2Q^+), una especie neutra (HQ^0), un zwitterión

(HQ^\pm) y un anión (Q^-). Las constantes de disociación (K_1 y K_2) están definidas por las siguientes ecuaciones:

$$K_1 = [HQ][H^+]/[H_2Q^+]$$

$$K_2 = [Q^-][H^+]/[HQ]$$

$$\text{Dónde } [HQ] = [HQ^0] + [HQ^\pm]$$

Las fracciones de las distintas especies, a un pH dado, pueden ser obtenidas a partir de las siguientes ecuaciones:

$$f(H_2Q^+) = [H^+]^2 / \{ [H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2 \}$$

$$f(Q^-) = K_1K_2 / \{ [H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2 \}$$

$$f(HQ) = [H^+]K_1 / \{ [H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2 \}$$

Si la constante de disociación de la amina es mayor que la del ácido carboxílico, la forma HQ va a predominar como forma neutra (HQ^0). Cuando sucede a la inversa, predomina en forma de zwitterión (HQ^\pm). En solución, las formas H_2Q^+ y Q^- , predominarán a valores de pH altos y bajos, respectivamente, y [HQ] alcanza el máximo cuando el $pH = PI = (pK_1 + pK_2)/2$, siendo PI el punto isoeléctrico del compuesto (Riley y col., 1989).

La solubilidad de las quinolonas esta determinada por el pH de la solución (mínima solubilidad cuando [HQ] es máxima, o sea en el PI) y limitada por la solubilidad intrínseca (S_0) de las especies sin carga (HQ) y está descrita por la ecuación:

$$S = S_0 (1 + K_2/[H^+] + [H^+]/K_1)$$

De todo lo anterior se desprende que las constantes de disociación de las quinolonas ayudan a definir tanto el estado de ionización del compuesto a un pH dado, como el perfil de solubilidad del mismo en función del pH en el que se encuentre. Los perfiles solubilidad-pH de las quinolonas tienen forma de U o V con el mínimo centrado en el punto isoeléctrico.

En el caso del ácido nalidíxico, el pK_{a1} de 0,94, determinado por espectrofotometría, corresponde a la disociación del nitrógeno heterocíclico protonado, mientras que el pK_{a2} de 6,02 corresponde a la disociación del grupo ácido carboxílico. La mayoría de las quinolonas nuevas tienen constantes de disociación para el grupo carboxilo similares a la del ácido nalidíxico ya que la sustitución en la posición 7 parece tener poco efecto sobre la disociación del grupo carboxilo. En contraste, estas nuevas quinolonas tienen un grupo funcional básico en posición 7, como, por ejemplo, el grupo piperacínico, que posee un pK_a mucho más elevado que el del nitrógeno heterocíclico del ácido nalidíxico. El resto de los nitrógenos son tan débilmente básicos que, en general, no revisten mayor importancia. Los valores de pK_a para la mayoría de las fluoroquinolonas están alrededor de 5,46 y 6,32 para el grupo carboxilo y entre 5 y 9 para la amina básica, dependiendo de la naturaleza química de la cadena lateral (Riley y col., 1989; Sörgel y Kinzig, 1993). Los pK_a de algunas quinolonas se detallan en la tabla I.1. La **marbofloxacina** presenta pK_a de 5,5 y 8,2, con un punto isoelectrico de 6,85.

En resumen, las fluoroquinolonas son ácidos orgánicos débiles, que entre pH 6 y pH 8, aproximadamente (el pK_a del grupo funcional ácido y básico) predominan en forma no ionizada. Al estar sólo levemente ionizados a pH sanguíneo son suficientemente liposolubles como para penetrar bien en los tejidos. A pH fisiológico la solubilidad en agua es baja, variando según la quinolona. Por su carácter anfótero son solubles tanto en soluciones ácidas como básicas (Vancutsem y col, 1990). Las preparaciones para administración parenteral contienen sales solubles del fármaco que son estables como polvo y en solución acuosa y que deben ser almacenadas al resguardo de la luz. Los cationes multivalentes (magnesio, aluminio, calcio, zinc) pueden producir quelación de algunas quinolonas, lo que reduce la absorción enteral de las quinolonas (El Bahri y Blouin, 1991).

Tabla I.1. pKa y punto isoelectrico de algunas fluoroquinolonas (Sörgel y Kinzig, 1993; Martínez y col., 2006).

fluoroquinolona	pKa	PI
amifloxacina	6,3-7,3	6,80
ciprofloxacina	6,0-8,8	7,40
difloxacina	6,1-7,6	6,85
danofloxacina	6,0-8,6	7,30
enoxacina	6,0-8,5	7,25
enrofloxacina	6,0-8,7	7,35
fleroxacina	5,7-8,0	6,85
lomefloxacina	5,8-9,3	7,55
marbofloxacina	5,5-8,2	6,85
norfloxacina	6,2-8,7	7,45
ofloxacina	6,1-8,2	6,8
pefloxacina	6,3-7,6	6,95
rufloxacina	5,6-8,7	7,15
sarafloxacina	5,6-8,2	6,90
sparfloxacina	6,3-8,8	7,55
temafloxacina	5,6-8,7	7,15

I.1.4. MECANISMO DE ACCIÓN

ADN bacteriano y topoisomerasas

El cromosoma bacteriano está compuesto por una doble cadena de ADN de aproximadamente 1300 μ de longitud que debe caber dentro de bacterias cuyo tamaño medio es de 2 μ de largo por 1 μ de ancho. Para resolver este hecho, el cromosoma bacteriano debe adoptar una conformación especial, enrollándose alrededor de núcleos de ARN en una serie de dominios. El tamaño de cada dominio se reduce al ser enrollado apretadamente por la introducción de superenrollamiento. Este superenrollamiento se produce, en la mayoría de las bacterias, en el sentido contrario al de la hélice de ADN en su forma lineal, y es calificado como "superenrollamiento negativo". Cada dominio es superenrollado estando el cromosoma momentáneamente cortado. Una vez finalizado el superenrollamiento, el ADN es sellado nuevamente. El superenrollamiento, incluidos los procesos de corte y resellado del ADN, es

introducido por medio de enzimas llamadas topoisomerasas (Smith y Lewin, 1988).

Una topoisomerasa es una enzima que selectivamente altera el número de giros de una molécula de ADN de doble cadena, resultando moléculas idénticas excepto por el número de giros (topoisómeros).

Las topoisomerasas actúan también en la replicación del ADN. Para una molécula de ADN del tamaño de la de *Escherichia coli* (unos 4.000.000 de pares de bases), con una periodicidad en el enrollamiento de aproximadamente 10 pares de bases, las hebras se entrelazan unas 400.000 veces, lo cual significa que deben desenrollarse 400.000 veces para separarse durante la replicación semiconservativa, por lo que es necesario un mecanismo giratorio para desenrollar la doble hélice (Wolfson y Hooper, 1989).

La enzima que corta la doble cadena de ADN, introduce el superenrollamiento negativo y sella nuevamente el ADN, fue descrita por primera vez entre 1976 y 1977 y es llamada topoisomerasa II (o ADN girasa en procariotas). Además de introducir superenrollamiento negativo, es capaz de remover tanto el enrollamiento negativo como el positivo del ADN (relajación del ADN). Esto es fundamental para la replicación, ya que el superenrollamiento negativo es necesario para la iniciación de la replicación y el enrollamiento positivo que se acumula delante de la horquilla de replicación impediría la propagación de esta horquilla si no fuera removido por la ADN girasa. De manera que esta enzima es necesaria para la iniciación, propagación de la horquilla y terminación de la replicación del ADN y también para su transcripción, reparación, recombinación y transposición.

La ADN girasa está compuesta por cuatro subunidades, dos monómeros A, de peso molecular 105.000 Da, codificados por el gen *gyrA* y dos monómeros B de 95.000 Da, producto del gen *gyrB*. Existe uno de estos tetrámeros por dominio. Las subunidades A introducen un corte en cada hebra

de ADN dentro de cada dominio. Las subunidades B son las encargadas de introducir el superenrollamiento, utilizando una molécula de ATP por cada giro que es removido. Por cada dominio se remueven alrededor de 400 giros para ser compactado. El superenrollamiento negativo resultante se sella dentro de cada dominio por las subunidades A, que son las que reparan los cortes que ellas mismas introdujeron (Smith y Lewin, 1988).

Existe otra enzima que es blanco secundario de las fluoroquinolonas, la topoisomerasa IV. Esta, al igual que la ADN girasa, es esencial para la replicación del ADN, sin embargo su función parece ser la separación de cromátides hermanas al terminar el ciclo de replicación para permitir la segregación hacia las células hijas. La topoisomerasa IV tiene una estructura similar a la de la ADN girasa y esta compuesta por dos subunidades codificadas por el gen *parC* (homólogas a las subunidades A de la topoisomerasa II) y dos subunidades codificadas por el gen *parE* (homólogas a las subunidades B de la topoisomerasa II) (Hooper, 1998).

Efecto de las quinolonas sobre las topoisomerasas

La acción de las quinolonas se basaría en impedir que los precursores del ADN sean incorporados al ADN maduro (impedir el resellado del ADN). Estos precursores serían, posteriormente, destruidos por exonucleasas bacterianas y esta inducción de la síntesis de proteínas intervinientes en la respuesta "SOS" es la que produciría la lisis del ADN que precede a la muerte de la bacteria (Vancutsem y col., 1990; Lecoœur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). En este sentido, se observó que el ácido nalidíxico causaba una acumulación anormal de precursores de ADN de cadena simple de $18,8 \times 10^6$ Da de peso molecular en número aproximado de 66 por cromosoma, lo cual coincide con el número de dominios observados en el ADN bacteriano (el cromosoma de *Escherichia coli* está subdividido en 65 regiones, cada una con un dominio terminal de aproximadamente 20 μ de longitud unido a un núcleo de ARN) (Smith y Lewin, 1988).

Tanto la ADN girasa como la topoisomerasa IV son afectadas por las quinolonas, aunque existen diferencias en el grado en que cada una de estas enzimas se ve alterada, dependiendo de los microorganismos. Algunos autores señalan que, para el caso de bacterias gram negativas como *Escherichia coli* o *Neisseria gonorrhoeae*, la enzima diana principal es la ADN girasa, mientras que en otras, como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae* la enzima más sensible es, generalmente, la topoisomerasa IV (Boswell y Wise, 1998; Hooper, 1998)

Las quinolonas afectarían a la subunidad A de las topoisomerasas impidiendo el sellado del ADN, e inhibiendo el superenrollamiento negativo del ADN, la relajación del ADN superenrollado y los procesos de catenación y decatenación. Sin embargo, se ha observado que mutaciones que afectan a la subunidad B de la ADN girasa, también inducen modificaciones en la sensibilidad bacteriana a las fluoroquinolonas, y, por tanto, parecería que las fluoroquinolonas podrían afectar no sólo a la subunidad A, sino también a la subunidad B (Hooper, 1998; Smith y Lewin, 1988). De esta manera, las quinolonas inhiben casi todas las actividades de las topoisomerasas, interfiriendo con la replicación y transcripción del ADN y con la segregación del cromosoma bacteriano (Smith y Lewin, 1988; Fitton, 1992). Además de bloquear la síntesis de ADN, inducen el sistema "SOS" de reparación del mismo y producen alteraciones en el ADN, causando la muerte de la bacteria. En este sentido, Neuman (1988) sugiere que la inhibición del resellado de las hebras de ADN por acción de las quinolonas, daría lugar a la degradación del ADN cromosómico, lo que explicaría el mecanismo de acción bactericida de estos compuestos. La unión de la girasa al ADN y la ruptura del mismo no parecen afectadas por las quinolonas (Wolfson y Hooper, 1989).

Maxwell y Critchlow (1998) sugieren tres mecanismos de muerte bacteriana inducida por quinolonas:

Mecanismo A: Es común a todas las quinolonas. Requiere síntesis de ARN y proteínas, y es efectivo sólo frente a bacterias en replicación. Envuelve

aparentemente el bloqueo de la replicación por el complejo girasa-quinolona en el ADN.

Mecanismo B: No requiere síntesis de ARN y proteínas, y puede actuar en bacterias que no se están reproduciendo.

Mecanismo C: Requiere síntesis de ARN y proteínas, pero no de división celular. Podría correlacionarse con atrapamiento de complejos de topoisomerasa IV en el ADN.

La inhibición de las topoisomerasas bacterianas, y, por lo tanto, de la replicación del ADN por las quinolonas, causa una rápida muerte de la célula bacteriana, con una tasa y magnitud que aumentan a medida que aumenta la concentración hasta que alcanza un máximo ("concentración bactericida máxima") aproximadamente a una concentración de 30 a 60 veces la CIM (concentración inhibitoria mínima). A partir de este máximo, la tasa de muerte bacteriana disminuye y las quinolonas pueden exhibir un efecto paradójico o efecto "Eagle". Este efecto paradójico es causado por la inhibición de la síntesis de ARN a altas concentraciones del antimicrobiano, produciéndose una bacteriostasis (Smith y Lewin, 1988; El Bahri y Blouin, 1991; Boswell y Wise, 1998; Lecoer Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). Esta curva concentración-respuesta bifásica, con una primera fase en la que el número de bacterias muertas aumenta al aumentar la concentración del antimicrobiano, y una segunda fase en la que sucede lo contrario, se observa solamente en exposiciones cortas al antimicrobiano (Vancutsem y col., 1990). Se propone que estas diferencias concentración-dependiente en el efecto de los fármacos puede estar asociada con la diferencia entre las concentraciones necesarias para inhibir el superenrollamiento del ADN versus aquellas necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano. En general, se estima que el primer mecanismo es entre 1 y 2 veces menos sensible que el segundo (Guthrie y col, 2004).

El cloranfenicol, la rifampicina, el dinitrofenol o la carencia de aminoácidos interfieren con el efecto bactericida de las quinolonas. Estos tratamientos tienen en común la inhibición de la síntesis de proteínas, lo cual

sugiere que el efecto bactericida de las quinolonas requiere la síntesis activa de proteínas (Smith y Lewin, 1988; Wolfson y Hooper 1989; Vancutsem y col., 1990). La presencia de cortes no unidos en las hebras de ADN actuaría como señal de inducción para la síntesis *de novo* de las exonucleasas que serán las encargadas de destruir el ADN (Smith y Lewin, 1988).

Una de las propiedades más importantes de un agente antibacteriano es la posibilidad de dañar a las bacterias sin dañar a los organismos superiores. A pesar de que, tanto las bacterias como las células eucariotas poseen ADN de doble cadena, existen diferencias fundamentales en la manera en que el ADN está organizado. Las bacterias poseen un solo cromosoma, compuesto por un 70 % de ADN, 20% de ARN y 10 % de proteína (en su mayoría ARN polimerasas). Este cromosoma no posee una envoltura nuclear y está condensado mediante superenrollamiento negativo. Por otro lado, cada uno de los cromosomas de las células eucariotas está compuesto de cromatina asociada a pequeñas proteínas básicas llamadas histonas que forman complejos alrededor de los cuales el ADN se enrolla para disminuir su longitud y forma lo que se llama un nucleosoma. Los mamíferos poseen una topoisomerasa II que, de forma similar a la ADN girasa, realiza cortes y sella la doble cadena de ADN, pero que, a diferencia de la enzima bacteriana está compuesta sólo por dos subunidades, cada una con un peso molecular de 170.000 Da. Algunos autores sostienen que la topoisomerasa II de eucariotas no introduce superenrollamiento negativo (Brown, 1996), pero otros describen la posibilidad de que genere ADN superenrollado en aquellas regiones de cromatina donde los genes están siendo activamente transcritos (Smith y Lewin, 1988). La topoisomerasa II de eucariotas, a diferencia de la ADN girasa, no es afectada por las fluoroquinolonas, probablemente debido a las diferencias estructurales y funcionales existentes entre las dos enzimas (Smith y Lewin, 1988; Brown, 1996). Sin embargo, la actividad de las fluoroquinolonas sobre la topoisomerasa II de mamíferos ha sido asociada con genotoxicidad (Brown, 1996). Gootz y col. (1994) sugieren que aquellas quinolonas con configuración *cis*-3,5-dimetilpiperacina en C7 poseen mayor selectividad por la ADN girasa bacteriana que el análogo *trans* -3,5-

dimetilpiperacina, y que la concentración necesaria para inhibir las enzimas de la replicación de los mamíferos sería unas 100 veces mayor que la concentración que inhibe las correspondientes enzimas bacterianas, lo que daría como resultado un margen de seguridad muy favorable a las fluoroquinolonas (Vancutsem y col, 1990).

I.1.5. PROPIEDADES *IN VITRO*

Las quinolonas presentan una acción bactericida concentración dependiente, aunque algunos autores sugieren que para el caso de los microorganismos gram positivos, el efecto de las quinolonas sería tiempo dependiente (Keck y Borne, 1995; Spreng y col., 1995; Cester y col., 1996). No obstante, para *Staphylococcus aureus* se describe actividad concentración-dependiente de la orbifloxacin (Ganière y col., 2004), mientras que Walker & Dowling (2006) también consideran que la acción de fluoroquinolonas es concentración dependiente en todos los casos.

Se ha observado que la concentración bactericida mínima (CBM) se encuentra muy próxima a la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Barry, 1989), hallándose relaciones CBM/CIM para varias quinolonas que suelen estar entre 1 y 3 (Phillips y col., 1988). Las CIMs, por lo tanto, darán una buena aproximación de la actividad bactericida *in vitro* de la molécula.

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a las quinolonas es afectada por el pH, y parecen ser menos sensibles cuando los tests *in vitro* son realizados en orina que cuando son realizados en medio con buffer, pero el pH óptimo de acción depende de cada compuesto (Phillips y col., 1988; Barry, 1989). Mientras que la norfloxacin, ciprofloxacin u ofloxacin son más activas a pH 7.4 que a pH 5.6, ocurre lo contrario para las quinolonas de primera generación como el ácido nalidíxico, la flumequina, la cinoxacin o el ácido oxolínico (Phillips y col., 1988). Por otro lado, parecería ser que, si bien las fluoroquinolonas son más activas en medios alcalinos contra las bacterias gram negativas, la sensibilidad de las bacterias gram positivas no se vería afectada por el pH (Brown, 1996). Aparentemente, las quinolonas con un

anillo piperacínico en C7 son menos activas en condiciones ácidas y las que no poseen este sustituyente son menos activas en medio alcalino. El efecto del pH puede estar relacionado con la carga total de la molécula, lo cual influye en la capacidad para penetrar la célula bacteriana (Barry, 1989). A pesar de todo esto, el efecto de la disminución del pH no resulta suficiente para justificar la diferencia de los tests *in vitro* realizados en orina y en medio de cultivo. La orina podría contener también grandes cantidades de magnesio. El aumento de los iones magnesio disminuye la actividad de las quinolonas, independientemente del pH.

Se desconoce el grado en que estas observaciones *in vitro* se relacionan con la situación clínica (Phillips y col., 1988; Barry, 1989), pero se cree que probablemente tenga poca importancia clínica debido a las altas concentraciones de fluoroquinolonas alcanzadas en orina.

Las concentraciones bactericidas máximas obtenidas con *Escherichia coli* para ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina fueron 0,15, 0,9 y 1,5 µg/ml respectivamente, mientras que para el ácido nalidíxico fue de 90 µg/ml. Estos datos son de fundamental aplicación práctica, ya que las concentraciones registradas para la ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina son alcanzadas en suero durante la terapia, mientras que la concentración bactericida máxima para el ácido nalidíxico, si bien se obtiene en orina, excede ampliamente las concentraciones séricas que alcanza el compuesto (Smith y Lewin, 1988).

I.1.5.1. ESPECTRO DE ACTIVIDAD DE LAS FLUOROQUINOLONAS

Mientras la actividad antibacteriana de las quinolonas antiguas se limitaba esencialmente a la familia *Enterobacteriaceae*, los agentes más modernos poseen un amplio espectro de actividad que incluye bacterias gram negativas, gram positivas, micoplasmas y anaerobios. Sin embargo, hay una tendencia entre las quinolonas a que el aumento de actividad contra gram positivos sea a expensas de una relativamente menor actividad contra microorganismos gram negativos (Percival, 1991).

A continuación se resume la actividad *in vitro* de las quinolonas frente a los distintos grupos de microorganismos.

Enterobacterias

Las quinolonas son activas contra las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Contra la mayoría de estas especies, el ácido nalidíxico, el ácido pipemidínico y la cinoxacina tienen actividades similares (CIMs entre 1 y 4 µg/ml). El primer derivado quinolónico, el ácido oxolínico, es bastante más activo (CIMs \leq 0,5 µg/ml). Las fluoroquinolonas poseen mucha mayor actividad que las quinolonas antiguas frente a estos microorganismos. La norfloxacin, por ejemplo, es de 10 a 100 veces más activa que el ácido nalidíxico (Barry, 1989). Se ha observado que la ciprofloxacina es uno de los agentes de este grupo más activos contra las enterobacterias, mientras que la difloxacina es uno de los menos activos (Phillips y col, 1988). Son ejemplos de la sensibilidad de las enterobacterias a las fluoroquinolonas la CIM de la enrofloxacin frente a cepas de *Escherichia coli* aisladas de leche de vacas con mastitis de 0,14 µg/ml (0,03-1 µg/ml) (Walser y col., 1993), la CIM de la orbifloxacina de 0,05-0,78 µg/ml ante cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de cerdos con gastroenteritis (Hamana y col., 1994) o la CIM de la difloxacina frente a *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Klebsiella pneumoniae* (0,06 µg/ml) (Vancutsem y col., 1990).

Otros aerobios gram negativos

Otros microorganismos gram negativos sensibles a las fluoroquinolonas son *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp. y algunas especies de pseudomonas, brucella, pasteurella, moraxella, bordetella, haemophilus (sobre todo *Haemophilus influenzae*), vibrio, neisseria, acinetobacter, gardnerella, branhamella y legionella (Barry, 1988; Phillips y col., 1988; Vancutsem y col., 1990; Brown, 1996; Lecoer Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998; García y col., 2000)

Pseudomonas aeruginosa es sensible a muchas fluoroquinolonas, pero es apreciablemente menos sensible que los bacilos entéricos, siendo todas las cepas resistentes al ácido nalidíxico. La difloxacin es poco activa contra *Pseudomonas aeruginosa*. Otras pseudomonas como *Ps. fluorescens*, *Ps. acidovorans* o *Ps. putida*, son sensibles a las fluoroquinolonas, sobre todo a las fluoroquinolonas más modernas, (Phillips y col., 1988; Barry, 1989), al igual que ocurre con *Moraxella* spp., *Brucella melitensis*, *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (Phillips y col., 1988). La sitafloxacin resultó ser la fluoroquinolona más activa contra *Brucella melitensis* (CIM₉₀ = 0,12 µg/ml), seguida por la levofloxacin (CIM₉₀ = 0,5 µg/ml), la ciprofloxacina, la trovafloxacin y la moxifloxacin (CIM₉₀ = 1 µg/ml) y la ofloxacin, la grepafloxacin o la gatifloxacin (CIM₉₀ = 2 µg/ml) (Trujillano Martín y col., 1999).

Gram positivos

La mayoría de las fluoroquinolonas son sólo marginalmente efectivas contra los cocos gram positivos, *Listeria* spp. y *Corynebacterium* spp. Los estreptococos, enterococos y los bacilos gram positivos suelen ser resistentes. La sensibilidad de estos microorganismos varía de una fluoroquinolona a la otra. El ácido nalidíxico carece de actividad contra bacterias gram positivas. La temafloxacin o la gemifloxacin son más potentes que la ciprofloxacina o la ofloxacin contra estafilococos y enterococos (Brown, 1996; Hardy y col., 2000). Otras fluoroquinolonas como sparfloxacin o tosufloxacin también han demostrado buena actividad contra estos microorganismos, así como contra *Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes* y *Bacillus* spp. (Brown, 1996). A diferencia de lo que ocurre con muchos antimicrobianos, los enterococos no son apreciablemente diferentes de otros estreptococos en su sensibilidad a las quinolonas (Phillips y col., 1988). Todos los compuestos son más activos contra estafilococos que contra estreptococos. Los estafilococos son sensibles a las fluoroquinolonas, a pesar de que las CIMs suelen hallarse justo debajo de los puntos de corte de sensibilidad de 1 µg/ml. La CIM de la enrofloxacin

contra cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche de vacas con mastitis varió entre 0,03 y 0,5 µg/ml (Walser y col., 1993). Los estafilococos coagulasa positivos y coagulasa negativos no difieren significativamente en su sensibilidad a las fluoroquinolonas y parecería que los estafilococos meticilino-resistentes tampoco presentan diferencias con los meticilino-sensibles en su sensibilidad a estos fármacos (Phillips y col., 1988; Barry, 1989).

Anaerobios

Aunque las fluoroquinolonas poseen cierta actividad contra microorganismos anaerobios, algunos autores coinciden en que deben ser considerados clínicamente resistentes (Watt y Brown, 1986; Fernandes y col., 1986; Barry, 1989). Sin embargo, algunas de las fluoroquinolonas más modernas, como temafloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin, moxifloxacin, grepafloxacin, premafloxacin, gatifloxacin y, sobre todo, clinafloxacin y sitafloxacin (DU-6859a), poseen cierta actividad contra bacterias anaerobias (Phillips y col., 1988; Barry, 1989; Boswell y Wise, 1998; Ihrke y col., 1999; Appelbaum, 1999). *Bacteroides fragilis* y *Clostridium difficile* son relativamente resistentes a las quinolonas (Phillips y col., 1988; Barry, 1989). Las bacterias anaerobias gram negativas (excepto *Clostridium perfringens* y las espiroquetas) son, generalmente, resistentes.

Otros microorganismos

Las micobacterias suelen ser poco sensibles a las fluoroquinolonas. Las CIM₉₀ para *Mycobacterium tuberculosis* se encuentran entre 1 y 2 µg/ml y para *Mycobacterium avium* son mucho mayores (Phillips y col., 1988; Barry, 1989). La ciprofloxacin, levofloxacin y grepafloxacin son las que mayor actividad presentaron contra *M. tuberculosis* (CIM₉₀ = 1 µg/ml); la ofloxacin presentó una actividad intermedia (CIM₉₀ = 2 µg/ml), mientras que la trovafloxacin o la gemifloxacin son poco activas contra este microorganismo (CIM₉₀ = 164 µg/ml y 8 µg/ml, respectivamente) (Ruiz Serrano y col., 2000). Las

fluoroquinolonas que contienen un grupo ciclopropilo en la posición 1 (como la ciprofloxacina, enrofloxacin o danofloxacina) tienen actividad contra *Mycobacterium leprae* (Brown, 1996). *Nocardia asteroides* y *Ureaplasma ureolyticum* son, normalmente, resistentes a las quinolonas. Por la facilidad de penetrar en los leucocitos, las fluoroquinolonas son activas contra patógenos intracelulares como clamidias y micoplasmas (El Bahri y Blouin, 1991; Brown, 1996; Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). *Chlamydia trachomatis* es resistente al ácido nalidíxico, enoxacin y norfloxacina, pero, al igual que *Coxiella burnetii*, sensible a la difloxacina y ciprofloxacina (Phillips y col., 1988). La CIM de enrofloxacin frente a cepas de *Chlamydia psittaci* aisladas de pavos fue de 0,25 µg/ml (Butaye y col., 1997). La ciprofloxacina presenta casi el doble de actividad que la norfloxacina, rosoxacin, ácido nalidíxico y ácido oxolínico frente a *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma hominis* (Brown, 1996). La danofloxacina también ha demostrado ser activa contra algunas especies de micoplasmas, como *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* (CIM 0,008-0,5 µg/ml (Bradbury y col., 1994). Las CIM de la enrofloxacin contra cepas de *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma ovipneumoniae* y *Mycoplasma arginini* aisladas de lesiones pulmonares de ovinos y bovinos se encuentran entre 0,003 y 0,048 µg/ml (Eissa y col, 1999). La CIM de fleroxacin frente a *Mycoplasma gallisepticum* es 0,015 µg/ml (Jiang y col., 1998). *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma pullorum* y *Mycoplasma iowae* resultaron sensibles a la ciprofloxacina, enrofloxacin y norfloxacina, mientras que *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallinaceum* y *Mycoplasma iners*, mostraron menor sensibilidad (Eissa, 1996).

I.1.5.2. ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA MARBOFLOXACINA

Marbofloxacina tiene buena actividad frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas incluyendo algunos anaerobios patógenos. Es bactericida y micoplasmicida a bajas concentraciones y eficaz contra microorganismos que son resistentes a los β-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, antagonistas

del ácido fólico y macrólidos.

Los datos de la actividad *in vitro* de la marbofloxacin contra distintos patógenos aislados de bovinos se muestran en la tabla I.2.

Tabla I.2. Actividad *in vitro* de la marbofloxacin frente a los principales patógenos de los bovinos (Drugeon y col., 1997; Marbofloxacin Reference Book, 1999).

Bacteria	CIM ₅₀ (µg/ml)	CIM ₉₀ (µg/ml)	rango
<i>Pasteurella multocida</i>	0,018	0,057	0,008-2
<i>Pasteurella haemolytica</i>	0,019	0,17	0,008-2
<i>Haemophilus somnus</i>	0,021	0,03	0,015-0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,2	0,5	0,25-1
<i>Escherichia coli</i>	0,012	0,145	0,008-16
<i>Klebsiella</i> spp.	0,04	0,05	0,03-0,06
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	0,015-0,03
<i>Mycoplasma bovis</i>	0,35	0,48	0,25-1

I.1.6. EFECTO POSTANTIBIÓTICO

El efecto persistente de la inhibición del crecimiento bacteriano después de la exposición del microorganismo al agente antimicrobiano se denomina efecto postantibiótico (PAE). Se define como la diferencia entre el tiempo que tarda un cultivo problema (el que se ha sometido a la acción del antimicrobiano) y un cultivo control del mismo tamaño de inóculo en crecer en 1 log UFC/ml, siendo:

$$PAE = T - C$$

donde T es el tiempo que tarda el recuento de células viables en aumentar en 1 log desde el tiempo 0 en el cultivo problema y C es el tiempo correspondiente en el cultivo control.

El efecto postantibiótico se observó por primera vez poco después de la introducción de la penicilina en terapéutica, al comprobar que estafilococos expuestos a penicilina G durante 20 minutos y transferidos después a un

medio libre de antibiótico, no recuperaban el crecimiento normal hasta pasadas 1 a 3 horas.

El conocimiento de este mantenimiento de la actividad antibacteriana es importante para el establecimiento de los regímenes posológicos de los antimicrobianos. El efecto postantibiótico *in vitro* está en función del tiempo de contacto del antimicrobiano con la bacteria y de la concentración del antimicrobiano durante la fase de impregnación. Cuanto mayor es el tiempo de impregnación y mayor es la concentración, mayor será el efecto postantibiótico. La duración del efecto postantibiótico *in vivo* puede ser modificada por varios factores: concentración de antimicrobiano alcanzada en el sitio de infección, tiempo de exposición al antimicrobiano, pH, tamaño del inóculo, medio en el que se encuentra el antimicrobiano. Se cree que este efecto podría deberse, en el caso de macrólidos, tetraciclinas o cloranfenicol, al tiempo requerido para que el fármaco se libere de su unión al ribosoma y en el caso de los fármacos que ejercen su acción mediante inactivación de enzimas (β -lactámicos) podría reflejar el tiempo requerido por la bacteria para la síntesis *de novo* de dichas enzimas (Mediavilla y col., 1997).

Las fluoroquinolonas presentan un efecto inhibitor *in vitro* sobre los gérmenes durante 3 a 5 horas después de que la concentración de antibiótico del medio de cultivo descendió por debajo de la CIM y hasta de 18 horas *in vivo* (Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). Este prolongado efecto postantibiótico, lo ejercen tanto frente a bacterias gram negativas como a algunas gram positivas, lo cual favorece la instauración de intervalos posológicos prolongados (Ingerman y col., 1986; Vogelmann y Craig, 1986).

Según Brown (1996), el efecto postantibiótico podría estar relacionado, en parte, con disminución de la adherencia del microorganismo a las células. Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw (1998) sugieren que la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano después de la exposición del microorganismo al agente antimicrobiano podría estar ligada a un refuerzo de los mecanismos de defensa del huésped (opsonización o fagocitosis facilitada), un defecto en la formación de la pared interna, un retardo en el crecimiento bacteriano o una

pérdida de las capacidades de adhesión.

Para el caso específico de la marbofloxacin, la duración del efecto postantibiótico se ha probado en cepas aisladas en caninos, felinos, bovinos y porcinos. Los datos obtenidos se reflejan en la tabla I.3. Se puede observar que la duración del efecto postantibiótico varía con la especie y la concentración del antimicrobiano utilizada.

Tabla I.3. Efecto postantibiótico de la marbofloxacin (Spreng y col, 1995, Marbofloxacin Reference Book, 1999).

microorganismo/ especie de la que se aisló	CIM ($\mu\text{g/ml}$) marbofloxacin	concentración de marbofloxacin probada	efecto postantibiótico (h)
<i>Staphylococcus intermedius</i> / canino	0,2	2xCIM 4xCIM	2,1 2,4
<i>Staphylococcus aureus</i> / felino	0,2	2xCIM 4xCIM	0,7 1,1
<i>Escherichia coli</i> / bovino	0,024	2xCIM 4xCIM	0,53 1,9
<i>Escherichia coli</i> / canino	0,01	2xCIM 4xCIM	0,9 1,7
<i>Salmonella typhimurium</i> / bovino	0,024	2xCIM 4xCIM	0,5 1,33
<i>Pasteurella multocida</i> / bovino	0,012	2xCIM 4xCIM	1,57 0,77
<i>Pasteurella multocida</i> / felino	0,02	2xCIM 4xCIM	0,7 1,1
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> /porcino	0,05	2xCIM 4xCIM	1,1 4,62

I.1.7. INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINAMIA (PK/PD)

La interacción entre la farmacocinética y la actividad antimicrobiana *in vitro* de los antimicrobianos, conocida también como parámetros PK/PD, puede utilizarse para determinar la dosis necesaria para alcanzar un resultado clínico (Martínez y col., 2006).

Asegurar una exposición adecuada luego de una dosis inicial de una fluoroquinolona es tan importante como obtener concentraciones superiores a la CIM en el sitio de localización de los microorganismos sensibles luego de dosificaciones repetidas. Por ello, este grupo de antimicrobianos han sido catalogados generalmente como de acción "concentración-dependiente" (Zhanel, 2001).

Los parámetros asociados a esta acción incluyen el área bajo la concentración sérica o plasmática durante 24 h (ABC_{0-24}), dividida por la CIM del aislamiento clínico o bien la CIM_{90} de bacterias del mismo género y especie (ABC/CIM), y el pico de concentración sérica o plasmática máxima (C_{max}), dividida por la CIM o CIM_{90} , conocida como C_{max}/CIM . Estos parámetros están estrechamente relacionados, y son ambos importantes para asegurar eficacia antimicrobiana (Martínez y col., 2006). Cabe acotar, sin embargo, que para ciertos microorganismos (ej.: *Bacillus anthracis*) el valor de ABC/CIM es más predictivo de eficacia que la C_{max}/CIM (Deziel y col., 2001).

Diversa terminología ha sido utilizada para caracterizar el comportamiento PK/PD de los antimicrobianos. Mouton y col. (2005) indican algunos puntos importantes:

- ABC debe expresarse en términos de fármaco libre. Si se utiliza un régimen de dosis múltiple, el ABC debe ser medido en un intervalo de 24 h en condiciones de estado estacionario.
- ABC/CIM es generalmente expresada en términos de dimensión de tiempo. Sin embargo, puede expresarse como un valor sin dimensión.
- $T > CIM$ representa el porcentaje acumulativo de un período de 24 h en el cual la concentración del fármaco excede la CIM en el estado estacionario.
- El PAE *in vitro* es el período de supresión del crecimiento bacteriano luego de una breve exposición del microorganismo a un antimicrobiano. En este caso, el fármaco ha sido removido (la unidad es tiempo).
- El PAE *in vivo* representa la diferencia en tiempo para el número de

bacterias en un tejido de animales tratados *versus* controles, para un incremento de 1 log 10 sobre los valores observados cuando las concentraciones de fármaco en suero o en el sitio de infección caen debajo de la CIM (la unidad es tiempo).

- El efecto sub-CIM es cualquier efecto de un antimicrobiano sobre un microorganismo a concentraciones debajo de la CIM (la unidad es tiempo).

- El efecto sub-CIM pos antibiótico es el efecto de concentraciones sub-CIM en el crecimiento bacteriano luego de exposiciones seriales a concentraciones que exceden la CIM (la unidad es tiempo).

En el proceso infeccioso, donde existe una gran carga bacteriana (efecto del inóculo), el riesgo de eventos mutacionales se incrementa simplemente por la ley de la probabilidad. En estos casos, para lograr eliminar la mayor cantidad de bacterias, se debería alcanzar una C_{\max}/CIM de entre 10 y 12 (Drusano y col., 1993). Sin embargo, cuando no es factible alcanzar estos valores, la contribución del tiempo de exposición de los patógenos al antimicrobiano cobra importancia, y el parámetro mejor indicador de eficacia pasa a ser ABC/CIM (Owens & Ambrose, 2002).

Diversos estudios demostraron que los valores de ABC/CIM necesarios para alcanzar el éxito terapéutico son diferentes para infecciones producidas por Gram negativos o Gram positivos, siendo aproximadamente de 125 y 30-50, respectivamente (Forrest y col., 1993; Wright y col., 2000). Nightingale y col. (2000) también demostraron que los valores de ABC/CIM para fluoroquinolonas de tercera y cuarta generación y microorganismos Gram positivos, son substancialmente inferiores si la C_{\max}/CIM es ≥ 10 .

Una vez que una cierta relación de ABC/CIM o C_{\max}/CIM ha sido alcanzada para un compuesto en particular, mayores incrementos de estos índices pueden no causar mayor eficacia clínica. Por ejemplo, se ha demostrado que a elevadas concentraciones de fluoroquinolonas, tanto la síntesis de ARN como la proteica pueden ser inhibidas, causando una menor actividad bactericida (Lode y col., 1998).

El PAE *in vivo* generalmente es de mayor duración que el PAE *in vitro*,

aunque existen notables excepciones como los estreptococos β -hemolíticos. Por tanto, optimizando la relación C_{\max}/CIM se retardará el re-crecimiento de los patógenos por varias horas. (Martínez y col., 2006).

Existe información que respalda la conclusión de que los parámetros PK/PD pueden predecir la posibilidad de emergencia de resistencia durante la terapia antimicrobiana (MacGowan & Bowker, 2002). Las fluoroquinolonas, en general, han sido recientemente reclasificadas en Europa, teniendo en consideración, no sólo el paradigma de Dosis Concentración Dependiente (Walker y Dowling, 2006), sino también el concepto de Concentraciones Preventivas de Mutaciones (MPC), que se define como la concentración más baja de un fármaco capaz de prevenir el crecimiento de las cepas mutantes resistentes, de primer paso, menos susceptibles.

En este sentido, se ha propuesto un nuevo enfoque en la prevención de la aparición de resistencia a los antimicrobianos, que consiste en la administración del fármaco a dosis que consigan unas concentraciones plasmáticas que superen en todo momento el umbral que presentan las cepas mutantes espontáneas, resistentes a los medicamentos y evitar así el crecimiento y amplificación selectiva de cualquier subpoblación mutante. Además, se ha sugerido que la amplificación selectiva de las cepas mutantes espontáneas resistentes a los fármacos, es más pronunciada en el intervalo de concentraciones plasmáticas de dicho fármaco entre la MIC para la población de campo (silvestre) y la MPC. Este intervalo se define como la ventana de selección de mutantes (MSW) (Kesteman y col., 2009).

Por otro lado, el parámetro MIC se relaciona con las poblaciones sensibles a los medicamentos y no es adecuado para la prevención del crecimiento de mutantes resistentes. Teóricamente, para prevenir el desarrollo de mutantes resistentes, las concentraciones del antimicrobiano deben superar durante el mayor tiempo posible las MPC (Pasquali y Manfreda 2007), y este hecho no se tiene en consideración con los índices de eficacia clásicos AUC/MIC o C_{\max}/MIC , o el aplicado en antimicrobianos tiempo dependiente $T > MIC$. Por ello, algunos autores han sugerido nuevos índices de eficacia, $T >$

MPC (tiempo en el que las concentraciones del fármaco superan las MPC) y AUC/MPC, que podrían ser buenos predictores para la prevención de la aparición de resistencias (Olofsson y col., 2006), y recientemente Kesteman y col., (2009) han propuesto un nuevo índice $T > MPC/TMSW$.

Por tanto, la situación ideal o más deseable cuando se lleva a cabo un tratamiento antimicrobiano eficaz y que a su vez no promueva el incremento de resistencias, es que se instaure la terapia lo antes posible, de forma que el tamaño del inoculo o carga bacteriana en el animal sea la menor posible (metafilaxis o profilaxis) (Kesteman y col., 2009), y si esto no ha sido posible, conseguir unos niveles plasmáticos y tisulares por encima de la ventana de selección de mutantes.

En conclusión, los modelos *in vitro*, en conjunto con los estudios en animales se presentan como una buena manera de optimizar la eficacia antimicrobiana y prevenir la emergencia de resistencias (MacGowan & Bowker, 2002). No obstante, es necesario en muchos casos estudiar la relación particular entre cada molécula antimicrobiana y una especie bacteriana específica para evitar las generalizaciones, que pueden conducir a veces a conclusiones erróneas. Finalmente, hay que considerar que es la integridad del sistema inmunitario del hospedador la que determinará la importancia de los parámetros PK/PD estudiados sobre la eficacia del tratamiento (Toutain y col., 2002).

I.1.8. INDICACIONES TERAPÉUTICAS EN RUMIANTES

Desde un punto de vista clínico, el valor de las fluoroquinolonas radica, entre otros aspectos, en que poseen, en general, buena absorción en el tracto gastrointestinal tras la administración oral, buena distribución tisular, bajo índice de reacciones adversas y un amplio espectro de actividad. Se mencionan a continuación las posibles indicaciones clínicas de este grupo de antimicrobianos.

Infecciones del tracto urinario

El perfil farmacocinético de las fluoroquinolonas les permite alcanzar altas concentraciones en orina durante prolongados periodos de tiempo, lo cual, junto con la excelente actividad de las fluoroquinolonas contra la mayoría de los patógenos que se aíslan en las infecciones del tracto urinario (son activas contra enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos), las hace útiles para el tratamiento de estas patologías.

La actividad antibacteriana de ciertas quinolonas se ve reducida por valores de pH urinario bajos. De todas maneras, las concentraciones alcanzadas en orina exceden ampliamente las requeridas para matar a la mayoría de los uropatógenos.

Infecciones del tracto respiratorio

Constituyen sin duda una indicación principal de las fluoroquinolonas, considerando que alcanzan concentraciones altas en tejido bronquial, esputo y secreciones sinusales y poseen una excelente actividad *in vitro* contra la mayoría de los patógenos respiratorios más importantes. Son activas contra *Haemophilus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, micobacterias y pasteurellas, mientras que no presentan tanta actividad contra *Streptococcus pneumoniae*. Una de las quinolonas más utilizadas para infecciones respiratorias de bovinos es la danofloxacin (Brown, 1996).

Estudios realizados en caninos, felinos, bovinos y porcinos confirman la eficacia clínica de la marbofloxacin en el tratamiento de las afecciones respiratorias.

En terneros y vacas con sintomatología respiratoria, la marbofloxacin produjo una rápida disminución de la temperatura rectal y una mejoría clínica que supera a los resultados obtenidos con ceftiofur y oxitetraciclina (Scott, 1997; Thomas y col, 1998b).

Infecciones gastrointestinales

Las fluoroquinolonas alcanzan altas concentraciones en la mucosa intestinal, dentro de los macrófagos y en la luz del tracto gastrointestinal cuando son administradas por vía oral (Andriole, 1988), siendo altamente efectivas en el tratamiento de las diarreas bacterianas agudas (Fitton, 1992). Muchos de los patógenos bacterianos responsables de infecciones gastrointestinales son sensibles a las fluoroquinolonas, como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp.

La eficacia de la marbofloxacin fue probada en terneros con diarrea neonatal (Marbofloxacin Reference Book, 1999). Los microorganismos aislados fueron colibacilos, de los que un 80,4 % resultaron sensibles a la marbofloxacin. El porcentaje de cura clínica fue de 87,8 %.

Mastitis e infecciones del tracto genital

La buena difusión de las fluoroquinolonas en el tejido mamario inflamado y las altas concentraciones que se alcanzan en leche tras la administración parenteral (Walser y col., 1993; Kaartinen y col., 1995; Aramayona y col., 1996; Shem Tov y col., 1997a, 1997b; El Banna y El Sooud, 1998; Gips y Soback, 1999) justifican el tratamiento sistémico de las mastitis con estos agentes, considerándose, en general, que las fluoroquinolonas son eficaces contra la mayoría de los patógenos de presentación frecuente en las mastitis, incluso *Staphylococcus* spp. intracelulares (Sumano, 1993).

La marbofloxacin demostró ser efectiva en las mastitis agudas a gram negativos del ganado vacuno lográndose una cura clínica de 60,7 % y una cura bacteriológica de 67,9 % (Marbofloxacin Reference Book, 1999).

Otros posibles usos clínicos

Las fluoroquinolonas presentan propiedades farmacológicas de interés en la prevención de las infecciones quirúrgicas, ya que poseen una prolongada semivida de eliminación, una amplia distribución tisular y un amplio espectro. Pueden ser también útiles en el tratamiento de osteomielitis bacterianas, alcanzando tasas de cura de 70 % en administraciones prolongadas (≥ 4 semanas) en infecciones debidas a microorganismos gram negativos y estafilococos meticilino resistentes (Fitton, 1992).

I.1.9. RESISTENCIAS BACTERIANAS

Una de las principales razones por las cuales el ácido nalidíxico cayó en desuso fue el alto nivel de resistencia que desarrolló rápidamente, ya en los años ´60 (Brown, 1996). La resistencia bacteriana de un paso a las fluoroquinolonas ocurre menos frecuentemente (10^{-9} a 10^{-11} bacterias, aunque a veces llega a 10^{-7}) que con el ácido nalidíxico (10^{-6} - 10^{-8}) (Norris y Mandell, 1988; Brown, 1996). Estas bajas frecuencias están relacionadas con el mecanismo cromosómico de inducción de resistencia y sugieren una mutación única en un único *locus* (Brown, 1996). Sin embargo, es posible seleccionar bacterias ampliamente resistentes mediante pases seriados en medios conteniendo quinolonas. Everett y col. (1996) sostienen que la resistencia de alto nivel de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas puede incluir la adquisición de mutaciones en múltiples *loci*.

El desarrollo de resistencia generalmente significa un cambio de 2 a 8 veces en la concentración inhibitoria mínima (CIM). La exposición a concentraciones sub-inhedoras de quinolonas aumenta las posibilidades de selección de resistencia (Norris y Mandell, 1988). Esta circunstancia puede darse clínicamente en algunos regímenes de dosificación como en la administración en agua de bebida o en alimentos, o bien en casos de baja calidad de preparados farmacéuticos, que no lleven la concentración indicada

en el etiquetado, donde pueden ser administradas dosis inadecuadas (Hooper, 1998).

La resistencia a las fluoroquinolonas se puede producir de forma espontánea en poblaciones de bacterias con una frecuencia de 10^6 a 10^8 después de un proceso gradual, que implica mutaciones en el gen que codifica las dianas terapéuticas, como son la ADN-girasa y la topoisomerasa IV (Kesteman y col., 2009; Wetzstein H.G., 2005).

Resistencia cruzada

Las bacterias resistentes a las quinolonas clásicas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico) pueden presentar una sensibilidad reducida o resistencia a las fluoroquinolonas. Por su parte, se ha demostrado que las bacterias que son resistentes a una fluoroquinolona presentan generalmente resistencia cruzada a otras moléculas de este grupo. Esta resistencia cruzada incluye tanto a las fluoroquinolonas usadas en animales, como a aquellas disponibles para uso en medicina humana (Griggs y col., 1994). Sin embargo, la presión de resistencia cruzada (ej.; influencia del paso en medio conteniendo enrofloxacin en la sensibilidad a la flumequina y viceversa) produce un menor desarrollo de resistencia que la presión directa, por lo que el desarrollo de resistencia a una fluoroquinolona de uso en medicina humana es menor al usarse diferentes quinolonas en medicina veterinaria (Brown, 1996).

La resistencia cruzada aparece con mayor frecuencia para las quinolonas más antiguas y menos potentes como el ácido nalidíxico y la flumequina (Brown, 1996).

La resistencia cruzada con beta lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, antimicrobianos polipeptídicos, sulfonamidas, diaminopirimidinas y nitrofuranos no ocurre frecuentemente, sin embargo, han sido descritas mutaciones (generalmente las que causan alteración en la

permeabilidad de membrana) que confieren resistencia a las fluoroquinolonas, siendo esta cruzada con cefalosporinas, tetraciclinas y cloranfenicol (Brown, 1996). Otras mutaciones que confieren resistencia a fluoroquinolonas pueden causar hipersensibilidad a beta lactámicos, aminoglucósidos y novobiocina (Brown, 1996), y también serán descritos más adelante mecanismos de resistencia cruzada entre aminoglucósidos y fluoroquinolonas transmisibles por plásmidos.

Mecanismos implicados en la aparición de resistencias

Los mecanismos bacterianos de resistencia a las quinolonas pueden ser divididos en tres categorías generales: alteraciones en las enzimas diana (ADN girasa o topoisomerasa II y topoisomerasa IV), alteración en la permeabilidad al fármaco que afecta el acceso del mismo a dichas enzimas diana (Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998; Hooper 1998) e inactivación del fármaco por enzimas (Robicseck y col., 2006).

Los mecanismos que se describirán a continuación pueden ocurrir simultáneamente en una misma bacteria, conduciendo a niveles muy elevados de resistencia bacteriana (Martínez y col., 2006).

Alteraciones en las enzimas diana

Dos son las enzimas bacterianas diana de las quinolonas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV.

La **ADN girasa** está compuesta por dos subunidades A (GyrA) y dos subunidades B (GyrB) codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. Poco después del descubrimiento de la ADN girasa de *Escherichia coli*, se encontró que la resistencia al ácido nalidíxico era causada por mutaciones en el gen *gyrA*. En un principio se identificaron cuatro genes capaces de conferir resistencia al ácido nalidíxico: *nalA*, *nalB*, *nalC* y *nalD*, cuyas mutaciones determinaban una alteración en la sensibilidad de *Escherichia coli* a las

quinolonas. Se encontró que mutaciones en *nalA* producían un incremento en la resistencia a la mayoría de las quinolonas por acción sobre la subunidad A de la ADN girasa bacteriana. Después se encontraron otros mutantes, como *nfxA*, *cfxA*, *ofxA*, que también dan lugar a la aparición de resistencia al modificar la subunidad A de la girasa, y se consideran, junto con *nalA*, alelos del gen *gyrA*. También se observó que *nalC* y *nalD* (*nal-31* y *nal-24*, respectivamente) producen un aumento de la resistencia al afectar a la subunidad B y serían alelos correspondientes a *gyrB*. Las mutaciones en *nalB* estarían relacionadas con una alteración de la permeabilidad (Piddock y Wise, 1989).

Posteriormente, varios estudios en bacterias gram negativas han identificado alteraciones en un nucleótido, tanto en *gyrA* como en *gyrB*, que ocurren como mutaciones espontáneas y son seleccionadas por exposición a las quinolonas. Estas mutaciones producen cambios en aminoácidos de la subunidad GyrA o GyrB que son los responsables de la aparición de resistencia a las quinolonas o de reducción en la actividad (Hooper y Wolfson, 1993). Hay datos que indican que la exposición a las quinolonas es mutagénica para las bacterias y esta mutagenicidad podría aumentar la frecuencia de aparición de mutaciones que generen resistencia (Pellerin y col., 1998).

Las mutaciones responsables de la resistencia fueron localizadas entre los nucleótidos 199 y 318, que codifican para el extremo amino terminal de la subunidad GyrA entre los aminoácidos 67 y 106 en base a la numeración en *Escherichia coli* (Hooper, 1998). A esta zona se la denomina "región determinante de resistencia a las quinolonas" (RDRO) y se encuentra próxima al sitio activo de la subunidad A, la tirosina en la posición 122, en *gyrA* (Yoshida y col., 1990). Las mutaciones ocurren más frecuentemente en los nucleótidos 247 a 249 que corresponden al aminoácido serina en posición 83 (Ser83), que se substituye, generalmente, por una leucina, dando como resultado aumentos en las concentraciones inhibitorias mínimas. Como

ejemplo, se ha determinado que la CIM de ciprofloxacina pasa de 0,015-0,030 µg/ml en cepas salvajes de gérmenes Gram (-) a valores de 0,125-1 µg/ml en cepas resistentes (Wang y col., 1993). Se ha observado frecuentemente otra mutación que se produce en el aspartato en posición 87 (Musso y col, 1996).

Las mutaciones múltiples no son necesarias para la adquisición de resistencia. Por ejemplo, *Campylobacter* spp., un microorganismo que carece de Topoisomerasa IV, sólo precisa una mutación simple en *gyrA* para elevar las CIM de ciprofloxacina hasta 32 µg/ml (Wang y col., 1993). Esto explicaría la alta prevalencia de resistencia en dicho género bacteriano en comparación a *E. coli* aisladas de animales de consumo expuestos a fluoroquinolonas (Van Boven y col., 2003).

Las quinolonas se unen específicamente al complejo ADN girasa-ADN y las alteraciones en la posición 83 han sido asociadas con reducción en la unión fármaco-complejo (Hooper 1998). Así, cambios en los aminoácidos alterarían la estructura del sitio de unión de la enzima al ADN y la resistencia sería causada por una disminución en la afinidad del fármaco por el complejo ADN-enzima modificado.

Alteraciones en la subunidad GyrB también causan reducción en la sensibilidad a las quinolonas, pero ocurren menos frecuentemente que las mutaciones en *gyrA*. Las mutaciones en GyrB fueron localizadas en la porción media de la secuencia de aminoácidos, más comúnmente en las posiciones 426 (conteniendo asparagina en lugar de ácido aspártico) o 447 (conteniendo ácido glutámico en lugar de lisina) (Hooper, 1995).

La **topoisomerasa IV**, enzima esencial para la segregación, es también diana de las quinolonas dentro de la célula bacteriana.

La estructura de la topoisomerasa IV es similar a la de la ADN girasa y está compuesta por dos pares de subunidades: ParC y ParE (también denominada GrlA en *Staphylococcus aureus*) (Intorre y col., 2007). ParC es

homólogo a GyrA y ParE es homólogo a GyrB. Las mutaciones en ParC han sido localizadas en la región RDRQ equivalente, y más comúnmente en las posiciones 80 y 84 (Khodursky y col., 1995). Mutaciones en ParE también han sido descritas en regiones homólogas a las causantes de resistencia en GyrB.

En cuanto a la importancia relativa de las dos enzimas diana en la producción de resistencia, se encontró que, en *Escherichia coli*, mutaciones de gyrA y gyrB de forma independiente pueden causar resistencia a las quinolonas o disminución de la sensibilidad. Por el contrario, las mutaciones de parC y parE por sí solas carecen de efecto sobre la sensibilidad al fármaco. Mutantes dobles con mutaciones en gyrA y parC tienen mayores niveles de resistencia que mutantes que sólo presentan mutación en gyrA. Para *Staphylococcus aureus* este patrón se invierte. Las mutaciones en grlA o B por sí solas causan resistencia y las de gyrA sólo disminuyen la sensibilidad cuando van unidas a las anteriores. Estos patrones pueden ser mejor comprendidos en términos de sensibilidad relativa de las dos enzimas diana a una determinada quinolona. Por lo tanto, las mutaciones en la enzima diana más sensible contribuyen a la aparición de resistencia de un paso. Las mutaciones en la enzima menos sensible por sí solas no tienen efecto en la sensibilidad porque la interacción de la quinolona con la enzima más sensible causa la muerte celular sin importar el grado de afinidad por el fármaco de la enzima menos sensible. La diana principal de una determinada quinolona en una determinada especie es determinada por la enzima más sensible a esa quinolona.

Generalizando, puede decirse que para la mayoría de las quinolonas y la mayoría de las bacterias gram negativas la ADN girasa es la diana principal y, para la mayoría de especies de bacterias gram positivas, la diana principal es la topoisomerasa IV. Sin embargo, existen excepciones a este patrón, lo que indica que las dianas relativas están determinadas por la estructura del fármaco.

Alteraciones en la permeabilidad a las quinolonas

El segundo mecanismo por el cual se produce resistencia a las quinolonas está representado por alteraciones en la permeabilidad. Estas incluyen los cambios en las proteínas de membrana y los sistemas de expulsión dependientes de energía.

En *Escherichia coli*, la concentración intracelular de fármaco refleja un equilibrio entre el influjo a través de los poros de membrana, la membrana externa (posiblemente por interacción con los lipopolisacáridos), el transporte a través del periplasma y la membrana plasmática y los sistemas de expulsión. En bacterias gram positivas, la vía de entrada es menos complicada ya que no poseen membrana externa (Piddock, 1995).

Para muchas quinolonas, el tamaño y la naturaleza anfotérica aumentan la habilidad de difundir a través de los poros de membrana. Reducciones en los poros de membrana han sido asociadas con resistencia a las quinolonas en *E. coli* y *Pseudomonas* spp. (Hooper, 1998), pero es improbable que estas reducciones sean suficientes, por sí solas, para lograr una disminución en la concentración intracelular de fármaco que determine la aparición de resistencia. Estos poros estarían formados por la proteína OmpF en *Escherichia coli*, cuya síntesis está regulada por el gen *marA* (Piddock, 1995).

También se sugiere la acción de sistemas endógenos de expulsión, compuestos de una bomba presente en la membrana plasmática en bacterias gram positivas y unida a otras proteínas en periplasma y membrana externa en gram negativas. Estas bombas reciben energía de las fuerzas de movimiento de protones a través de la membrana y poseen amplios perfiles de sustratos. Las funciones fisiológicas normales de estas bombas no se conocen aun con certeza, pero se cree que su función sería remover toxinas de la célula. Las bombas de expulsión constitutivas e inducibles son un conocido mecanismo de resistencia de bacterias gram negativas y positivas a las fluoroquinolonas, y sería un método más importante que las mutaciones en los

genes que codifican la topoisomerasa IV (Martínez y col., 2006).

En estafilococos, se ha identificado el gen *norA* como el responsable de la síntesis de la bomba de expulsión, y la hiperexpresión de dicho gen da lugar a cierto nivel de resistencia a las quinolonas. En *Pseudomonas aeruginosa* la expulsión estaría relacionada con bombas de resistencia multidroga como el sistema MexA-B-OprM. Estos sistemas pueden mediar la resistencia a diversos antimicrobianos, incluyendo fluoroquinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (Piddock, 1995; Hooper, 1998). En *E. coli*, la de-represión del loci regulador *marA* o *soxS* conduce a una menor susceptibilidad a las fluoroquinolonas, vía una regulación al alza (*upregulation*) de la bomba de eflujo AcrAB-TolC y regulación a la baja (*downregulation*) de la porina OmpF. Este mecanismo confiere inmunidad a una gran variedad de agentes antimicrobianos, además de las quinolonas (Okusu y col., 1996).

Las quinolonas parecen diferir en la extensión en la que son sustratos de ciertas bombas de expulsión. Por ejemplo, en *Staphylococcus aureus*, las quinolonas más hidrofóbicas son menos afectadas por la hiperexpresión de NorA, sin embargo, los mecanismos de expulsión parecen tener un papel importante en la disminución de la susceptibilidad de las fluoroquinolonas más hidrofílicas (Jones y col., 2000). En general, las fluoroquinolonas más modernas parecen ser menos afectadas por los mecanismos de expulsión (Muñoz Bellido y col., 1999)

Las alteraciones en la permeabilidad de membrana parecen ser muy importantes ya que, a diferencia de las alteraciones en las enzimas, proporcionarían cierto grado de resistencia a otros agentes antimicrobianos no relacionados estructuralmente (Poole, 2000).

Inactivación del fármaco por enzimas

Este mecanismo, no reportado sino hasta hace unos pocos años, implica el desarrollo de una acetiltransferasa de aminoglucósidos. Esta enzima, que confiere resistencia frente a tobramicina, amikacina y kanamicina, es capaz de

N-acetilar compuestos como ciprofloxacina y norfloxacina en el nitrógeno amínico del sustituyente piperazínico. Si bien el incremento de la CIM frente a estos antimicrobianos es modesto (alrededor de 3 a 4 veces), es notable el aumento de la MPC (Mutant Prevention Concentration: menor concentración de quinolona requerida para prevenir el crecimiento de mutantes resistentes a partir un inóculo inicial de 10^{10} bacterias). Otras fluoroquinolonas, carentes del mencionado nitrógeno no sustituido (enrofloxacin, levofloxacin, gemifloxacin entre otras), no son afectadas por esta enzima (Robicsek y col., 2006).

Transmisión de la resistencia

Desde principios de los ´90 una alta incidencia de resistencia a las fluoroquinolonas ha sido observada entre cepas de *Salmonella enterica* serotipo *tiphymurium*, aisladas principalmente de ganado bovino, y el número de serotipos que exhibieron resistencia al ácido nalidíxico o susceptibilidad reducida a la enrofloxacin ha aumentado en el periodo 1992-1998 (Malorny y col., 1999).

En un estudio reciente sobre bacterias entéricas en unidades de cuidado intensivo de E.E.U.U. se determinó que más del 10 % de estos organismos fueron resistentes a ciprofloxacina. Otros estudios realizados en Hong Kong y Barcelona, indicaron un 40 y 25 %, respectivamente, de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas (Robicsek y col., 2006).

Atanassova y Ring (1998) registraron un aumento de la resistencia de campilobacter aislados de aves de corral entre 1994 y 1997. De la misma manera, la prevalencia de cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a enrofloxacin aisladas de productos de aves de corral, creció en el período 1982-1989 de 0 a 14 % y de 0 a 11 % en cepas aisladas de heces de seres humanos. Debido a la ruta de transmisión del mencionado género desde pollos a seres humanos, se cree que estos aumentos pueden estar relacionados con el uso del antimicrobiano en aves de corral (Endtz y col., 1991). A su vez, la Organización Mundial de la Salud registró la aparición de cepas de campilobacter de origen aviar, y de salmonellas resistentes a las quinolonas

(W.H.O., 1998).

Hasta hace algunos años los distintos autores coincidían en que los mecanismos implicados en la aparición de resistencia a las quinolonas eran únicamente de tipo cromosómico (Hooper 1998; Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998), desestimando la transmisión de resistencia de tipo plasmídica. Sin embargo, en la actualidad, se ha demostrado que este tipo de transmisión de resistencia bacteriana también es factible (Robicsek y col., 2006).

La primera referencia a la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos fue realizada a fines de los ´90 por Martínez-Martínez y col. (1998) en *Klebsiella pneumoniae*. Los genes transmitidos serían responsables de dos mecanismos de resistencia: La síntesis de una proteína denominada QnrA (por *quinolone resistance*), la cual se uniría a la ADN girasa o Topoisomerasa IV, inhibiendo su interacción letal con el ADN bacteriano; y por otro lado, la síntesis de la acetiltransferasa de aminoglucósidos anteriormente mencionada, mecanismo codificado por el gen (aac(6´)-Ib) (Robicsek y col., 2006).

Clínicamente, la resistencia a las quinolonas ha sido encontrada más frecuentemente con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, particularmente en heridas infectadas e infecciones pulmonares. Más recientemente, la resistencia ha sido registrada también en *Serratia marcescens* (Brown, 1996).

I.1.10. TOXICIDAD

Toxicidad articular

La toxicidad de las fluoroquinolonas son principalmente dosis y especie-dependientes (Bertino & Fish, 2000).

Las artropatías no inflamatorias en animales jóvenes son una forma de toxicidad poco frecuente de las quinolonas administradas en las dosis terapéuticas. Sin embargo, este potencial tóxico ha llevado a una restricción en el uso de quinolonas en individuos jóvenes y durante la gestación y

lactancia. Todas las quinolonas presentan esta toxicidad, aunque la ciprofloxacina parece ser la menos condrotóxica (Stahlman y col, 2000).

Estudios realizados con animales adultos no reflejaron alteraciones clínicas o histológicas (Stahlmann y Lode, 1988; Yoshida y col., 1998). Esta observación puede deberse a una estimulación temprana de las quinolonas en el metabolismo oxidativo de los condrocitos inmaduros (no sucede en los maduros) que puede precipitar la muerte celular (Thuong Guyot y col., 1994).

Toxicidad en el sistema nervioso central

Se han descrito signos de inquietud, mareos, dolor de cabeza, ataxia, temores, agitación, somnolencia o insomnio y convulsiones luego de la administración de quinolonas en seres humanos (Brown, 1996; Martínez y col., 2006).

Akahane y col. (1989) sugieren que la actividad epileptogénica puede deberse a porciones estructuralmente similares al ácido γ - aminobutírico (GABA) en los sustituyentes C7 de algunas quinolonas, que harían que la molécula se comportara como antagonista del receptor GABA. Las quinolonas con moléculas voluminosas (alquiladas) en la cadena lateral de C7 (temafloxacina, sparfloxacina) se unen en menor medida a los receptores GABA, los compuestos pirrolidínicos (tosufloxacina, clinafloxacina) muestran actividades intermedias sobre estos receptores y aquellos con un anillo piperazinil insustituido (ciprofloxacina, enoxacina y norfloxacina) son los que presentan una mayor unión (Bryskier y Chantot, 1995).

Por otro lado, Williams y Helton (1991) describen un mecanismo proconvulsivante independiente del receptor GABA y relacionado con la activación de los receptores excitatorios de aminoácidos, posiblemente ubicados en la región óptica del sistema nervioso central.

Además, altas concentraciones plasmáticas, debidas a una administración intravenosa rápida pueden causar otras alteraciones del sistema nervioso central de manera inmediata, posiblemente por liberación de

histamina. Estas alteraciones incluyen convulsiones, defecación, micción y emesis (Brown, 1996).

La **marbofloxacin**a no ha demostrado potencial epileptogénico tras la administración conjunta con ácido tolfenámico, incluso a dosis de hasta 10 veces las recomendadas (Bousquet Melou y col., 1997). A su vez, la administración conjunta de marbofloxacin a una dosis de 2 mg/kg y ketamina (durante una anestesia con ketamina y medetomidina) no produjo un aumento en el riesgo de episodios convulsivos (Bousquet Melou y col., 2000).

Toxicidad renal

Se ha descrito la aparición de cristales en el sedimento urinario tras la administración de altas dosis de fluoroquinolonas y se cree que podría deberse a la baja solubilidad de las mismas a pH alcalino. El hallazgo es más frecuente en algunos animales que en seres humanos, tal vez por el carácter más ácido de la orina de estos últimos (Takizawa y col., 1999). Se cree que estos cristales pueden ser la causa de las lesiones renales encontradas.

Mutagenicidad

La topoisomerasa II de procariotas es alrededor de 100 veces más sensible a la inhibición por quinolonas que su equivalente eucariota (Stahlmann y Lode, 1988). Para cada quinolona existe una concentración a la cual se produce clastogenicidad (desorganización del cromosoma), aunque esto, generalmente, ocurre a concentraciones que superan 300 a 1000 veces las CIMs (Bryskier y Chantot, 1995).

Fotosensibilización

La fotosensibilización ocurre con todas las quinolonas, aunque en distinta medida. En orden decreciente, el potencial fototóxico de algunas quinolonas *in vitro* es el siguiente: clinafloxacin >> lomefloxacin,

sparfloxacin >> trovafloxacin, ácido nalidíxico, ofloxacin, ciprofloxacin > enoxacin, norfloxacin (Snyder y Cooper, 1999). La mayor fototoxicidad es observada cuando C8 es sustituido con un halógeno. La presencia de un átomo de flúor (lomefloxacin, sparfloxacin y fleroxacin) parece aumentar las alteraciones químicas inducidas por los rayos UVA. El orden en que los distintos sustituyentes son propensos a producir fototoxicidad es el siguiente: $C-F \geq C-Cl > N > CH > CF_3 > C-OR$ (Bryskier y Chantot, 1995; Stahlman y Lode, 1999).

Shimoda (1998) postula que la reacción inflamatoria se daría porque especies reactivas de oxígeno, generadas por las quinolonas bajo radiaciones UVA dispararían la liberación de prostaglandinas de los fibroblastos dérmicos a través de la proteinquinasa C o tirosín quinasa, y que la histamina, la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o los productos de la lipooxigenasa-5 no estarían involucrados en el proceso.

Toxicidad reproductiva

En estudios realizados en ratas y perros con pefloxacin y enoxacin en dosis de 100 a 1000 mg/kg durante periodos prolongados, se han encontrado disminución de la espermatogénesis y atrofia testicular (Stahlmann y Lode, 1988).

En hembras preñadas de animales de laboratorio a las que se les administraron 810 mg/kg de ofloxacin, se han descrito disminución del peso corporal de los fetos, retraso en la osificación y muertes embrionarias, aunque estos efectos adversos no se produjeron en hembras tratadas con dosis menores (Watanabe y col., 1992). Los efectos teratogénicos no se han observado en las demás especies a las dosis terapéuticas (Brown, 1996).

Otros efectos adversos

Generalmente, la toxicidad de las quinolonas a dosis terapéuticas es leve y consiste en efectos a nivel gastrointestinal, como náuseas, vómitos,

diarrea o dolor abdominal. Ocasionalmente se han observado elevaciones de los niveles de aminotransferasas en suero y una leve y transitoria leucopenia con eosinofilia (Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998).

Se han registrado también lesiones hepáticas con algunas quinolonas, como la trovafloxacin, que fue retirada del mercado en la Unión Europea por esta razón y se ha descrito que las quinolonas pueden causar colestasis (Hautekeete y col., 1995).

Tendinitis y ruptura espontánea de tendones han sido reportadas en humanos durante o luego de la terapia con fluoroquinolonas. Por este motivo, se ha estudiado el efecto de la enrofloxacin en cultivos celulares de tendón equino (Yoon y col., 2004), y se ha demostrado que el fármaco inhibe la proliferación celular, induce cambios morfológicos, reduce el contenido de monosacáridos y altera la síntesis de proteoglicanos pequeños. Estos efectos fueron más pronunciados en células tendinosas de animales jóvenes en comparación a equinos adultos.

Ecotoxicidad

Las fluoroquinolonas experimentan solamente un metabolismo parcial en el organismo, y son excretadas como compuestos farmacológicamente activos en un buen porcentaje (Sukul y col., 2009). Esto, sumado a la remoción parcial que se logra en las plantas de tratamiento de efluentes conduce a una introducción continua en el medio ambiente (Lindberg y col., 2005). La estabilidad del anillo fluoroquinolona es la causa de la resistencia de estas moléculas a la acción de reactivos químicos.

Puede definirse a las fluoroquinolonas como contaminantes "pseudo-persistentes" (Hu y col., 2010), su ocurrencia fue documentada en agua (Speltini y col., 2010) y suelo (Sturini y col., 2010), a concentraciones máximas en el rango de microgramos por litro y miligramos por kilogramo, respectivamente. Estos compuestos, inicialmente presentes en medios

acuosos, se mueven rápidamente al suelo, debido a su fuerte adsorción en minerales y materia orgánica (Tolls, 2001).

La presencia de este tipo de moléculas en el medio ambiente puede significar un serio riesgo para el ecosistema y salud pública, principalmente por la habilidad para estimular la resistencia bacteriana, la cual puede transmitirse a otras bacterias ambientales, del agua de bebida o plantas, animales o seres humanos (Kummerer, 2004).

Por lo anteriormente expuesto, puede considerarse a las fluoroquinolonas como contaminantes ubicuitos de importancia emergente. Si bien no fueron fijados valores de tolerancia en los distintos compartimentos medioambientales, en 2008 la Agencia Europea del Medicamento (EMA) determinó un valor umbral general para los residuos de fármacos veterinarios, igual a 0,1 mg/kg en suelo y 0,1 µg/L en agua subterránea (EMA, 2008).

I.1.11. INTERACCIONES

Se ha demostrado que la quelación con cationes polivalentes puede resultar en inactivación de las fluoroquinolonas tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta reducción de la actividad puede deberse, entre otras cosas, a que la quelación disminuye la cantidad de fármaco disponible para ingresar en las bacterias (Marshall y Piddock, 1994). De la misma manera, la administración oral de quinolonas junto con compuestos que contengan estos cationes, daría lugar a una adsorción en el tracto gastrointestinal que jugaría un papel importante en la disminución que se observa en la biodisponibilidad oral de las quinolonas en estos casos (Sadowski, 1994). En estudios *in vitro*, tanto el Fe^{2+} , como el Al^{3+} , modificaron significativamente el perfil de disolución de las quinolonas, disminuyendo la cantidad total de fármaco disuelto (Rodríguez Cruz y col., 1999). La administración conjunta de quinolonas con sucralfato o antiácidos que contienen magnesio o aluminio, es lo que produce mayor efecto sobre la biodisponibilidad oral de estos antimicrobianos en seres humanos, seguida por la administración conjunta con hierro, con calcio o con zinc (Lomaestro y Bailie, 1995).

Las fluoroquinolonas interfieren en el metabolismo de otros fármacos a través de la inhibición de isoenzimas del citocromo P-450 hepático, aunque no todas ellas lo hacen en la misma magnitud (Shlosberg y col., 1997). Muchas quinolonas inhiben el metabolismo de las metilxantinas (teofilina, cafeína), con el potencial de generar efectos adversos, como hiperexcitabilidad nerviosa (llegando a ocurrir convulsiones en algunos casos) o cardíaca. Esto se debe al aumento de las concentraciones plasmáticas del estimulante durante la coadministración (Robson, 1992). Se ha visto que algunas quinolonas inhiben preferentemente las enzimas CYP1A1 y CYP1A2, que son parcialmente responsables del metabolismo de las metilxantinas (Vancutsem y Babish, 1996). Se postula que aquellas fluoroquinolonas que presentan un sustituyente voluminoso en posición-8 o que presentan un nitrógeno-4 en el grupo 7-piperazínico son menos capaces de interaccionar con el sistema CYP450, debido a una estructura menos plana. Un ejemplo de molécula con estas características es danofloxacin, fluoroquinolona de uso veterinario (Mizuki y col., 1996).

La combinación de algunas quinolonas con ciertos antiinflamatorios no esteroideos puede potenciar la producción de convulsiones como efecto adverso por interacción con el receptor GABA A (Murayama y col., 1992).

El sinergismo de las quinolonas con otros antimicrobianos es infrecuente *in vivo* y las combinaciones, *in vitro* o en modelos animales, raramente resultan en antagonismo (Neu, 1989). En estudios *in vitro* se ha encontrado que las quinolonas resultan sinérgicas con las penicilinas y fosfomicina contra *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la combinación con aminoglucósidos o beta lactámicos es indiferente contra *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp., al igual que la combinación con otros antimicrobianos contra estafilococos, enterococos y anaerobios.

I.2. FARMACOCINÉTICA DE QUINOLONAS

El ácido nalidíxico y, en general, las quinolonas de primera generación, o quinolonas clásicas, no son bien absorbidas en el tracto gastrointestinal y sufren un rápido aclaramiento, principalmente por vía renal, lo cual limita su uso al tratamiento de infecciones urinarias. A diferencia de estas quinolonas clásicas, las fluoroquinolonas presentan una mayor biodisponibilidad oral, una mayor permanencia en el organismo y una amplia distribución tisular. Poseen, en general, una baja unión a proteínas plasmáticas. El átomo de flúor en C-6 y el anillo piperacínico en C-7 mejoran la penetración celular con respecto a las antiguas quinolonas (Mitscher y col., 1989; Percival, 1991; Boswell y Wise 1998), y cadenas alquiladas en posición "para" del anillo piperacínico aumentan la liposolubilidad (Vancutsem y col., 1990). Esto, sumado a la baja unión a proteínas plasmáticas que generalmente presentan estos compuestos, da lugar a valores mayores en el volumen de distribución de las fluoroquinolonas con respecto a las quinolonas clásicas. En cuanto a la eliminación, las fluoroquinolonas, se eliminan por vía renal y/o biotransformación hepática y la participación de cada una de estas vías varía dependiendo de cada compuesto.

Las quinolonas, en general, presentan un comportamiento farmacocinético lineal, dosis dependiente, en un amplio rango de dosis. Así, los incrementos en las concentraciones séricas son directamente proporcionales a las dosis, mientras que otras propiedades farmacocinéticas, como la semivida o el aclaramiento, son independientes de la cantidad administrada (Bergan, 1988).

Absorción

Las fluoroquinolonas son, en general, bien absorbidas en el tracto gastrointestinal. Si bien la lipofilicidad de las fluoroquinolonas promueve su absorción pasiva por fenómenos de difusión, mecanismos activos de transporte intestinal también han sido demostrados para algunas de estas

moléculas, como por ejemplo, sparfloxacin, levofloxacin, ciprofloxacina y norfloxacina (Rabbaa y col., 1997).

La absorción es, generalmente, amplia y rápida en seres humanos, animales con estómago monocavitario y prerrumiantes (Vancutsem y col., 1990; Martínez y col., 2006).

De las fluoroquinolonas utilizadas en Medicina Veterinaria, la enrofloxacin presenta una biodisponibilidad oral relativamente alta en casi todas las especies estudiadas, registrándose valores de 72-100 % en perros (Cester y col., 1996; Monlouis y col., 1997), 100 % en gatos (Richez y col., 1997a), 83-149 % en cerdos (Nielsen y Gyrd Hansen 1997; Zeng y Fung, 1997), 80-89,2 % en pollos (Knoll y col., 1999), 62-78 % en caballos (Giguere y col., 1996; Haines y col., 2000), y 61 % en conejos (Broome y col., 1991) (Vancutsem y col., 1990; El Bahri y Blouin, 1991), aunque en rumiantes adultos fue sólo del 10 % (Vancutsem y col., 1990). La administración oral de danofloxacin se ensayó en cerdos y pollos, obteniéndose biodisponibilidades altas, de 89 y 99 %, respectivamente (Mann y Frame, 1992; Knoll y col., 1999).

Por otro lado, algunas quinolonas presentan una menor biodisponibilidad oral. Esto se observa por ejemplo con la ciprofloxacina y la norfloxacina en caballos y burros, respectivamente (Dowling y col., 1995; Lavy y col., 1995).

Las fluoroquinolonas, en general, alcanzan el pico de concentraciones plasmáticas dentro de las dos horas y media de la administración oral, aunque estos valores varían dependiendo de la quinolona y de la especie de que se trate (1988; Vancutsem 1990; Fitton, 1992; Lecoœur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). Por ejemplo, el tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (T_{max}) tras la administración oral de enrofloxacin en pollos, pavos, terneros, perros y caballos varía entre 0,5 y 2,5 horas (Bugyei y col., 1999; Knoll y col., 1999). Para la norfloxacina, el T_{max} tras la administración oral en pollos, cerdos y perros es de 0,22 h, 1,46 h y 2 h, respectivamente (Anadón y col., 1992, 1995; Albarellos y col., 1996).

La administración concomitante de compuestos que contengan cationes multivalentes (antiácidos, leche o sustitutos de la leche) disminuye la biodisponibilidad oral de las fluororquinolonas. La ingestión conjunta de alimentos, aparentemente, reduce la tasa de absorción de las fluoroquinolonas, aunque no modifica la cantidad absorbida (El Bahri y Blouin, 1991; Fitton, 1992; Brown, 1996; Martínez y col., 2006). Una explicación para dicha menor tasa de absorción puede ser que, en presencia de alimento, la velocidad de vaciado gástrico es inferior (Martínez y col., 2006).

Por otro lado, no se han encontrado diferencias significativas en la biodisponibilidad oral de la enrofloxacin en cerdos en ayunas con respecto a los que habían ingerido alimento (Nielsen y Gyrd Hansen, 1997).

La biodisponibilidad desde los sitios de inyección parenteral (i.m., s.c.) varía según la quinolona de que se trate. La enrofloxacin presenta una biodisponibilidad intramuscular alta en todas las especies estudiadas, con valores que oscilan entre 87,5 y 109,34 % (Cabanés y col., 1992; Abd El Aziz y col., 1997; Pijpers y col., 1997; Richez y col., 1997b; Zeng y Fung, 1997; Bailey y col., 1998; Bugyei y col., 1999). Por otro lado, la norfloxacin se absorbería pobremente tras la administración por esta vía en burros ($F = 31,5$ %) (Lavy y col., 1995), caballos ($F = 47,81$ %) (Park y col., 1994), cerdos ($F = 51$ %) (Shem Tov y Ziv, 1994) y conejos ($F = 53$ %) (Park y col., 1997).

Los datos disponibles sobre la biodisponibilidad subcutánea de las fluoroquinolonas indican una buena absorción para la enrofloxacin en pollos ($F = 80,8$ %) (Abd El Aziz y col., 1997) y la ofloxacin en conejos ($F = 111,67$ %) (Marangos y col., 1997). Al igual que sucede con la administración intramuscular, la norfloxacin presenta valores mas bajos de biodisponibilidad subcutánea, registrándose en cerdos una absorción del 64 % (Shem Tov y Ziv, 1994).

Distribución

Las fluoroquinolonas presentan, en general, una tasa de unión a las proteínas plasmáticas relativamente baja, de alrededor del 10 % al 40 %, en contraste con el 90 % de unión del ácido nalidíxico (Bregante y col., 2000). Entre las proteínas séricas, las quinolonas se unen, principalmente, a las albúminas (Okezaki y col., 1989). La unión varía, dependiendo de la estructura química de la quinolona. El heterociclo en posición 7 y los distintos sustituyentes en posición 8 influyen fuertemente la unión a proteínas, lo cual indicaría que estas porciones de la molécula son las que interactúan con las proteínas del plasma (Zlotos y col., 1998). Okezaki y col. (1989) encontraron que algunas quinolonas con grupo piperacínico o con un sustituyente relativamente grande en C7 exhibían un porcentaje de unión de un 20-30 %, mientras aquellas con un sustituyente pequeño en la posición 7 presentaban una unión de 70-80 %.

Existen, a su vez, diferencias interespecies en el grado de unión de algunas quinolonas que se deben a la diferente afinidad del fármaco por las respectivas albúminas (Bregante y col., 2000).

Las fluoroquinolonas autorizadas para uso veterinario presentan, en general, una baja tasa de unión a proteínas. Los datos que existen sobre el grado de unión de las fluoroquinolonas a las proteínas plasmáticas señalan un porcentaje de unión de la ciprofloxacina en vacas, caballos, cerdos, perros, conejos y pollos que varía entre un 30 y un 44 % (Villa y col., 1997). La enrofloxacin presenta una tasa de unión a proteínas cercana al 20 % en caballos y pollos, al 30 % en perros, gatos, pavos y cerdos, al 50 % en vacas, ratas y ratones y de alrededor del 70 % en ovejas y conejos (Villa y col., 1997; Bregante y col., 2000). La danofloxacin se une en un 20-30 % en terneros y pollos y en un 30-50 % en cerdos (Bregante y col., 2000). La tasa de unión de la difloxacin es del 30 % en cerdos, 35-40 % en perros y 10-35 % en pollos (Bregante y col., 2000). La fluoroquinolona que se une en menor

proporción a las proteínas plasmáticas es la norfloxacin, presentando un porcentaje de unión menor al 20 % en vacas (Gips y Soback, 1999), cercano al 10 % en cerdos y de alrededor del 5 % en pollos (Bregante y col., 2000).

Teng y col. (1996), describieron que la unión de la trovafloxacin a proteínas plasmáticas en ratas, perros y monos, es independiente de la concentración plasmática de dicho fármaco. En contraste, Okezaki y col. (1989) encontraron que, si bien la unión de las quinolonas a las proteínas del suero de la rata es, en general, independiente de la concentración cuando esta es inferior a 100 µg/ml, por encima de estos valores, la unión de algunas quinolonas, como el ácido nalidíxico, a las proteínas, disminuye a medida que aumenta la concentración del fármaco.

La baja unión de estos compuestos a proteínas plasmáticas, junto con el hecho de estar poco ionizados a pH sanguíneo, favorece la difusión de los mismos desde la sangre a los tejidos (Fitton, 1992). De esta manera, las fluoroquinolonas se caracterizan por una extensa difusión extravascular, alcanzando, en algunos tejidos, concentraciones mayores a las encontradas en plasma. En la mayoría de las especies, el volumen de distribución es mayor que para los betalactámicos y aminoglucósidos, lo que podría representar el secuestro intracelular de estos fármacos en varios tejidos (Brown, 1996).

La concentración en tejido renal, hepático, genital y traqueobronquial es superior a la concentración plasmática (El Bahri y Blouin, 1991; Fitton, 1992; Mann y Frame, 1992; Brown, 1996). El pico de concentraciones pulmonares de danofloxacin en vacas es 4,1 veces mayor que el pico de concentraciones plasmáticas y el área bajo la curva de concentraciones pulmonares en función del tiempo es 3,7 veces superior al área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas (Giles y col., 1991b).

En razón de su liposolubilidad, las fluoroquinolonas llegan a las cámaras anterior y posterior del ojo, atraviesan la placenta y la barrera

hematoencefálica (Aramayona y col., 1994; Brown, 1996; Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998). Además, estos fármacos se distribuyen ampliamente en piel, hueso, próstata y líquido prostático (El Bahri y Blouin, 1991; Brown, 1996).

A su vez, se alcanzan concentraciones elevadas, aunque no mayores que las plasmáticas, en saliva y secreciones bronquiales y nasales (Friis, 1993; Brown, 1996).

Las fluoroquinolonas también se concentran en las células fagocitarias (macrófagos alveolares, neutrófilos) y por ello son eficaces frente a microorganismos intracelulares (Brown, 1996; Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998).

El paso a leche varía dependiendo de la fluoroquinolona, en función de sus propiedades físico-químicas. En vacas, tras la administración intravenosa de enrofloxacin, el pico de concentraciones en leche fue alcanzado entre 0,7 y 1,3 h, mientras que para su metabolito, la ciprofloxacina, este pico ocurrió mucho después (5-8 h). A su vez, se encontraron concentraciones de enrofloxacin en leche paralelas a las concentraciones plasmáticas, mientras que la ciprofloxacina se concentró en la leche (Kaartinen y col., 1995). En conejas, la relación leche/plasma de la enrofloxacin y la ciprofloxacina, medida como $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$ fue de 2,59 y 3,61, respectivamente (Aramayona y col., 1996). Soback y col. (1994) encontraron concentraciones en leche hasta 40 veces superiores a las correspondientes concentraciones séricas tras la administración de nicotinato de norfloxacina a ovejas. El paso de danofloxacina desde la sangre a la leche, en ovejas y vacas, es rápido y extenso, tanto tras la administración intravenosa, como intramuscular, consiguiéndose concentraciones en leche que exceden a las concentraciones séricas ya desde los 60-90 minutos (para ovejas y vacas, respectivamente) de la administración intravenosa y 90-120 minutos después de la administración intramuscular (Shem Tov y col., 1997b, 1998). La relación de concentración en leche/concentración plasmática encontrada para ciprofloxacina, ofloxacina y

pefloxacina en humanos varía entre 0,75 y 1,84 (Brown, 1996).

El volumen de distribución de las fluoroquinolonas en el estado estacionario (V_{ss}) presenta valores generalmente superiores a 1 L/kg, que varían según la quinolona y la especie animal. Para algunas, incluso se han observado valores que superan los 4-5 L/kg (Broome y col., 1991; Friis, 1993; Shem Tov y Ziv, 1994; Dowling y col., 1995; Albarells y col., 1996; Brown, 1996; Cester y col., 1996; García Ovando y col., 1999; Kaartinen y col., 1997a; Monlouis y col., 1997; Nielsen y col., 1997; Pijpers y col., 1997; Richez y col., 1997b; Bailey y col., 1998; Haines y col., 2000; Lindecrona y col., 2000; Sobhy y col., 2000; Soliman, 2000).

Metabolismo

El grado de metabolismo de las fluoroquinolonas varía ampliamente. Como se expresó anteriormente, la ofloxacina es muy poco metabolizada y es excretada principalmente en orina como compuesto original. Por otro lado, la pefloxacina es ampliamente metabolizada a norfloxacina (Vancutsem y col., 1990; Brown, 1996), pero, en líneas generales, el metabolismo contribuye poco al aclaramiento de las fluoroquinolonas.

La mayoría de los metabolitos primarios de las fluoroquinolonas son activos, sin embargo, estos metabolitos tienen una semivida de eliminación más corta que el compuesto original. Las reacciones de biotransformación afectan, predominantemente, al grupo piperacínico y sus sustituyentes (Neuman, 1988).

En general, el metabolismo de fase I ocurre, principalmente, a través de hidroxilación y oxidación a oxoquinolonas. Otras reacciones de biotransformación que predominan son la N-desalquilación (pefloxacina, enrofloxacina, fleroxacina), la conjugación con ácido glucurónico en el nitrógeno en posición "para" del anillo piperacínico o en el ácido carboxílico en posición 3, la oxidación en la posición "orto" de la amina sustituida y la

apertura del anillo piperacínico (Vancutsem y col., 1990). Las fluoroquinolonas N-metiladas, como la pefloxacin y la fleroxacin, son atacadas en el anillo piperacínico para dar lugar a metabolitos oxo-, N-óxido y N-desmetil. En el caso de las fluoroquinolonas no metiladas, como la temafloxacin, la biotransformación del anillo piperacínico resulta en la formación de metabolitos oxo- y 2-aminoetilamina. El ácido nalidíxico es hidroxilado y luego glucuronizado (Brown, 1996). Los derivados oxo- muestran una limitada actividad *in vitro*, mientras que los N-óxidos y conjugados con ácido glucurónico, carecen de actividad antimicrobiana (Fitton, 1992; Brown, 1996).

Excreción

Aunque la excreción de la mayoría de las fluoroquinolonas ocurre, principalmente, por vía renal, la relativa contribución de las vías de eliminación renales y no renales (hepática y gastrointestinal), varía de una quinolona a otra. Así, la eliminación es casi exclusivamente renal para la ofloxacin, renal y no renal para la norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacin, fleroxacin, difloxacin, lomefloxacina, temafloxacin, y predominantemente no renal para la pefloxacin o la grepafloxacin (Bryskier y Chantot, 1995; Turnidge, 1999).

La excreción renal de las fluoroquinolonas se lleva a cabo por filtración, pero también por secreción tubular activa a través de la bomba de aniones orgánicos. El probenecid bloquea este transporte, pero debido a las otras rutas de excreción, la acumulación de las quinolonas no tiene lugar en gran medida tras la administración conjunta con este fármaco.

Un factor que puede determinar diferencias farmacocinéticas entre las fluoroquinolonas es el fenómeno de reabsorción renal. En función de las características físico-químicas de cada quinolona, variará la reabsorción tubular. Los compuestos menos polares, como la pefloxacin o la difloxacin, serán ampliamente reabsorbidos y exhibirán una semivida de eliminación prolongada. En contraste, los compuestos más polares, como la norfloxacin,

ciprofloxacina y enoxacina, presentarán valores más altos de aclaramiento renal, lo cual resulta en un acortamiento de la semivida de eliminación (Fitton, 1992). Los derivados N4 metilados, al ser los más lipofílicos, serían los más susceptibles de ser reabsorbidos (Sörgel y Kinzig, 1993).

El grado de excreción biliar es variable según el compuesto aunque generalmente es bajo (Fitton, 1992). Sin embargo, la excreción biliar de algunas fluoroquinolonas, como la pefloxacina, la trovafloxacina o la grepafloxacina puede ser considerablemente alta, lo cual las hace adecuadas para el tratamiento de infecciones del tracto biliar (Teng y col., 1996; Sasabe y col., 1999).

La semivida de eliminación varía dependiendo de la quinolona y de la especie animal. Así, tras la administración intravenosa, se encuentran valores altos (12 h) para la trovafloxacina en seres humanos (Ernst y col., 1997) y la marbofloxacina en perros (Schneider y col., 1996), y valores más bajos, como la semivida de 1,29 h para enrofloxacina en ratones (Bregante y col., 1999).

De las fluoroquinolonas utilizadas en medicina veterinaria, que fueron ensayadas en especies no rumiantes, la danofloxacina presenta una semivida de eliminación relativamente prolongada tras la administración intravenosa en cerdos y pollos con valores que oscilan entre 5,49 y 8 horas (Friis y Nielsen, 1997; Richez y col., 1997b; Knoll y col., 1999; Lindecrona y col., 2000). La enrofloxacina presenta valores levemente inferiores, de 1,29 a 5,6 horas (Broome y col., 1991; Flammer y col., 1991; Cabanes y col., 1992; Kung y col., 1993; Aramayona y col., 1996; Abd El Aziz y col., 1997; Kaartinen y col., 1997; Monlouis y col., 1997; Pijpers y col., 1997; Zeng y Fung, 1997; Bailey y col., 1998; Bregante y col., 1999; Knoll y col., 1999; Haines y col., 2000; Soliman y col., 2000), aunque algunos autores han registrado valores un poco más altos, de 6,7 h en gatos (Richez y col., 1997a), 7,52 h en pollos (García Ovando y col., 1999) y 7,73 h en cerdos (Richez y col., 1997b). Para la norfloxacina, se han descrito semividas de eliminación de 2,10 a 3,65 h

(Brown y col., 1990; Park y col., 1994; Shem Tov y Ziv, 1994; Anadón y col., 1995; Lavy y col., 1995; Albarellos y col., 1996; Gips y Soback, 1996), aunque en caballos se encontró una semivida de 6,45 h (Park y col., 1994). De manera similar a la norfloxacin, la ciprofloxacina muestra valores de 1,2 a 3,75 h (Abadía y col., 1994; Dowling y col., 1995; Aramayona y col., 1996; García Ovando y col., 1999; Fang y col., 1999; Sobhy y col., 2000), aunque algunos autores registraron semividas mayores, de 4,85 h en caballos (Yun y col., 1994) y 9,01 h en pollos (Atta y Sharif, 1997).

Transportadores intestinales pueden ser también importantes mecanismos de eliminación para algunas fluoroquinolonas como ciprofloxacina, norfloxacin y pefloxacina. Estos transportadores trasladan activamente el fármaco desde sangre a lumen intestinal e, interesantemente, se ha demostrado que diferentes quinolonas tienen transportadores distintos (P-glicoproteína para sparfloxacina, transportadores aniónicos o catiónicos para ciprofloxacina (Dautrey y col., 1999).

1.2.1. FARMACOCINÉTICA DE QUINOLONAS EN RUMIANTES

En rumiantes, la **absorción** oral de las fluoroquinolonas suele ser muy escasa. Según Vancutsem y col. (1990), la biodisponibilidad oral de la enrofloxacin en rumiantes adultos es de alrededor de 10 %, mientras que en terneros prerrumiantes, al igual que ocurre con las especies que poseen estómago monocavitario, llega hasta el 80 %. En cabras, esta quinolona se absorbe en un 23 % tras la administración oral (alcanzando el pico máximo o T_{max} a las 5,2 h de la administración) y en ovejas lo hace en un 60,6 % (Pozzin y col., 1997; Elmas y col., 2000). En esta misma especie, la administración oral de norfloxacin produjo una acumulación del fármaco en el rumen y una escasa biodisponibilidad, de tan sólo 4,04 % mientras que en corderos prerrumiantes la biodisponibilidad oral es de 73,51 %. El tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima (T_{max}) en ovejas presentó una alta variabilidad interindividual entre 10 y 24 horas después de la administración (González y col., 1997). Tras la administración oral de 5 mg/kg de

danofloxacin a terneros rumiantes, las concentraciones plasmáticas se hallaron en el límite de detección, o incluso debajo de éste, en todos los tiempos muestreados (Mann y Frame, 1992). La limitada biodisponibilidad oral de las fluoroquinolonas en rumiantes podría atribuirse a la biodegradación ruminal, a la quelación con cationes multivalentes presentes en el rumen y/o a la adsorción al contenido ruminal (González y col., 1997).

La absorción subcutánea e intramuscular de las quinolonas en rumiantes suele ser alta. La biodisponibilidad intramuscular muestra valores que oscilan entre 82 y 105,8 % para la enrofloxacin (Gavrielli y col., 1995; Kaartinen y col., 1995; García Ovando y col., 1996; Harron y col., 1997; Pozzin y col., 1997), entre 91 y 125,16 % para la danofloxacin (Giles y col., 1991b; Apley y Upson, 1993; Shem Tov y col., 1997b, 1998), de 82,42 % para la pefloxacin en ovejas (Moutafchieva y Djouvinov, 1997), de 73-106 % para la norfloxacin en terneros (Gips y Soback, 1996) y de 95,92 para la ciprofloxacin en cabras (El Banna y El Sooud, 1998).

La biodisponibilidad subcutánea de la enrofloxacin en vacas presenta valores altos, entre 82 y 137 % (Kaartinen y col., 1995; Martínez Larrañaga y col., 1997b; Stegemann y col., 1997), al igual que sucede con la danofloxacin en terneros ($F = 94 \%$) (Giles y col., 1991b).

El volumen de **distribución** de las fluoroquinolonas en rumiantes suele ser amplio, superior a 1 L/kg en todos los casos. La danofloxacin presenta valores de V_{ss} de 2,48-4,3 L/kg en terneros (Giles y col., 1991b; Apley y Upson, 1993; Friis, 1993), de 2,76 L/kg en ovejas (McKellar y col., 1998) y de 2,04 L/kg en vacas (Shem Tov y col., 1998). El V_{ss} registrado para la enrofloxacin en terneros es de 1,8-2,3 L/kg (Kaartinen y col., 1997b) y en vacas adultas es de 1,46 L/kg (Stegemann y col., 1997). La norfloxacin muestra, en ovejas, un V_{ss} de 1,05 L/kg (González y col., 1997), de 1,8 L/kg en terneros (Gips y Soback, 1996) y de 3,1 L/kg en vacas lactantes (Gips y Soback, 1999). En cabras lactantes, la ciprofloxacin presentó un V_{ss} de 2,14 L/kg (El Banna y El Sooud, 1998), mientras que García Ovando y col.(2000)

registraron, en esta especie, un valor de 3,37 L/kg. En ovejas esta quinolona presenta un V_{ss} de 2,35 L/kg (Llovería, 1992).

La semivida de **eliminación** de las fluoroquinolonas en rumiantes varía dependiendo de la quinolona y la especie de que se trate. Tras la administración intravenosa, la danofloxacin muestra una semivida de eliminación de 3,35 h en ovejas (McKellar y col., 1998) y valores entre 2,9 y 7,4 h en terneros (Giles y col., 1991b, Mann y Frame, 1992; Apley y Upson, 1993; Friis, 1993). La enrofloxacin presenta una semivida de 3,53 h en terneros (García Ovando y col., 1996), aunque los prerrumiantes muestran valores superiores (4,9-6,6 h) (Kaartinen y col., 1997b). En vacas, la semivida de esta quinolona es de 2,49 h (Bregante y col., 1999) y, en ovejas, de 3,8 h, similar a registrada para la danofloxacin (Mengozi y col., 1996; Pozzin y col., 1997). La norfloxacin muestra valores de 2,97 h en terneros (Gips y Soback, 1996), 5,88 h en vacas lactantes (Gips y Soback, 1999) y 6,2 h en ovejas (Soback y col., 1994), mientras que en cabras presenta una semivida muy corta, de 0,25 h (Jha y col., 1996).

I.2.2. FARMACOCINÉTICA DE MARBOFLOXACINA

En el caso de la marbofloxacin, la biodisponibilidad y el tiempo que tarda en alcanzar la concentración máxima (T_{max}) en las distintas especies, se resumen en la tabla I.11.

La biodisponibilidad intramuscular y subcutánea de esta quinolona es, aproximadamente, del 100 % en todas las especies estudiadas (perros, gatos, vacas, terneros, cerdos y conejos) (Petracca y col., 1993; Thomas y col., 1994a; Cester y col., 1996; Schneider y col., 1996; Marbofloxacin Reference Book, 1999; Schneider y col., 2000). En caballos Carretero y col. (2002) determinaron una biodisponibilidad algo inferior por vía intramuscular (88 %).

El volumen de distribución de la marbofloxacin en el estado estacionario (V_{ss}) es similar en la mayoría de las especies, observándose

valores de 1,36 L/kg en perros (Schneider y col., 1996), 1,16 L/kg en vacas, 1,35 L/kg en terneros (Thomas y col., 1994a), 1,3 L/kg en cerdas (Petracca y col., 1993), 1,95 L/kg en conejos (Schneider y col., 2000), 1,48 L/kg en caballos (Marbofloxacin Reference Book, 1999), 1,48 L/kg en gatos (Marbofloxacin Reference Book, 1999) y 1,16 L/kg en aves rapaces (ratoneros) (García Montijano y col., 2001). Sin embargo, en pollos se observa un menor volumen de distribución ($V_{ss} = 0,77$ l/kg) (Tafur Garzón, 2000).

Se ha observado una amplia penetración de marbofloxacina desde el plasma a la leche de vacas y ovejas y una acumulación del fármaco en la glándula mamaria con valores de ABC_{leche}/ABC_{plasma} que se encuentran entre 1,33 y 2,64 (Shem Tov y col., 1997a), lo que coincide con los resultados observados por Petracca y col. (1993) en cerdas en las que las concentraciones de marbofloxacina en leche superaron, en todos los tiempos, a las concentraciones plasmáticas correspondientes. Esta acumulación en leche se debe a las propiedades físico-químicas del compuesto como son su alta liposolubilidad y el punto isoeléctrico, que determinará, junto con el pH de la leche, el grado de disociación de la molécula.

La unión de la marbofloxacina a proteínas plasmáticas registrada en vacas es de alrededor del 25-40 %, del 15 al 30 % en perros (Bregante y col., 2000) y 18,4 % en cerdos (Petracca y col., 1993).

La marbofloxacina se elimina, en su mayoría, como forma intacta, aproximadamente dos tercios por vía renal y un tercio por bilis (Lecoeur Bitchatchi y Kolf Clauw, 1998; Marbofloxacin Reference Book, 1999).

La biotransformación de la marbofloxacina da lugar a la formación de 2 metabolitos (N-óxido marbofloxacina y desmetil marbofloxacina), aunque en cantidades limitadas (menos del 5 % de la dosis administrada) (Marbofloxacin Reference Book, 1999). La desmetil marbofloxacina posee actividad antibacteriana, equivalente a un décimo de la actividad del compuesto

original. Thomas y col. (1994a) estudiaron la eliminación de la marbofloxacin en vacas y en terneros prerrumiantes, encontrando que en las primeras, el compuesto se elimina en un 45 % por vía biliar y en un 54 % en orina, mientras que, en los terneros, la eliminación por dichas vías se produce en un 10 % y un 75 % respectivamente.

Los valores de aclaramiento plasmático, semivida de eliminación y tiempo medio de residencia de la **marbofloxacin** en las distintas especies se resumen en las tablas I.12., I.13. y I.14., respectivamente.

Tabla I.11. Biodisponibilidad (F) y T_{max} de la marbofloxacin en distintas especies (media \pm DS).

	oral		Intramuscular		subcutánea	
	F (%)	T_{max} (h)	F (%)	T_{max} (h)	F (%)	T_{max} (h)
perros ¹	105,3 \pm 29,7	2,5 \pm 1,2			98,7 \pm 25	0,9 \pm 0,2
gatos ²	84,6	1,54			97,6	1,88
cerdos ³	82,4 \pm 43,3*	2,75 \pm 1,89*	115	0,8		
vacas ⁴			112,85 \pm 21,7	0,79	110,94	0,73
terneros ⁵			102,74 \pm 25,7	0,71	91,81	0,66
ovejas ⁶			100	0,75		
conejos ⁷	84,5 \pm 16,6	1,23				
caballos ⁸	62,44	0,58	87,94 \pm 6,0	0,95 \pm 0,37	97,59	0,86
rapaces ⁹		2,31				
pollos ¹⁰	58,37	1,48				

¹Schneider y col., 1996. ^{2,3}Marbofloxacin Reference Book, 1999. ^{4,5}Thomas y col., 1994a; Marbofloxacin Reference Book, 1999. ⁶Marbofloxacin Reference Book, 1999. ⁷Schneider y col., 2000. ⁸Marbofloxacin Reference Book, 1999; Carretero y col., 2001. ⁹Waxman y col., 2000. ¹⁰Tafur Garzón, 2000. *Valores obtenidos en cerdas gestantes (Petracca y col., 1993).

Tabla I.12. Aclaramiento plasmático (Cl_{total}) de la marbofloxacin en distintas especies (media \pm DS).

especie	Cl_{total} (l/h·kg)
perros ¹	0,1 \pm 0,024
gatos ²	0,13
cerdos ³	0,17
vacas ⁴	0,31 \pm 0,06
terneros ⁵	0,15 \pm 0,05
caballos ⁶	0,25
conejos ⁷	0,4
rapaces ⁸	0,20 \pm 0,0072
pollos ⁹	0,17

¹Schneider y col., 1996. ²Marbofloxacin Reference Book, 1999. ³Marbofloxacin Reference Book, 1999. ^{4,5}Thomas y col., 1994a. ⁶Marbofloxacin Reference Book, 1999. ⁷Schneider y col., 2000. ⁸García Montijano y col., 2001. ⁹Tafur Garzón, 2001.

Tabla I.13. Semivida de eliminación de la marbofloxacin en distintas especies (media \pm D.E.).

especie	$t_{1/2el}$ (h)			
	i.v.	p.o.	i.m.	s.c.
perros ¹	12,4 \pm 2,6	14 \pm 4,9		13 \pm 3,3
gatos ²	10,28	8,54		13,12
cerdos ³	8,24	10,09 \pm 1,34*	9,48	
vacas ⁴	5,72 \pm 1,17		7,73	5,49
terneros ⁵	7,84 \pm 2,65		9,12	9,05
caballos ⁶	7,56	8,78	5,47 \pm 1,33	10,41
conejos ⁷	5,57	6,73		
rapaces ⁸	4,11 \pm 0,77	8,94		
pollos ⁹	5,26	9,03		

¹Schneider y col., 1996. ²Marbofloxacin Reference Book, 1999. ³Petracca y col., 1993; Marbofloxacin Reference Book, 1999. ^{4,5}Thomas y col., 1994a; Marbofloxacin Reference Book, 1999. ⁶Marbofloxacin Reference Book, 1999; Carretero y col., 2001. ⁷Schneider y col., 2000. ⁸Waxman y col., 2000; García Montijano y col., 2001. ⁹Tafur Garzón, 2001. *Valores obtenidos en cerdas gestantes (Petracca y col., 1993).

Tabla I.14. Tiempo medio de residencia (MRT) de la marbofloxacin en distintas especies (media \pm D.E.).

especie	MRT (h)			
	i.v	p.o	i.m.	s.c.
perros ¹	13,2 \pm 1,2	17,6		14,2
gatos ²		13,56		
caballos ³	6,35 \pm 1,15		6,91 \pm 0,95	
rapaces ⁴	5,79 \pm 1,01	8,34		
pollos ⁵	4,36	8,55		

¹Schneider y col., 1996. ²Heinen, 2000. ³Carretero y col., 2001. ⁴Waxman y col., 2000; García Montijano y col., 2001. ⁵Tafur Garzón, 2000.

I.2.3. FACTORES QUE PUEDEN MODIFICAR EL COMPORTAMIENTO FARMACOCINÉTICO DE LAS QUINOLONAS

Factores fisiológicos

Existen numerosos factores que pueden modificar, en mayor o en menor medida, el comportamiento cinético de los fármacos. Como se ha visto anteriormente, los valores de los parámetros farmacocinéticos pueden variar ampliamente entre las distintas especies, debido a las características anatómicas y/o fisiológicas propias de cada especie (diferencias anatómo-fisiológicas de los procesos digestivos, diferencias en los mecanismos de excreción, diferencias enzimáticas en el metabolismo, en el pH de algunos fluidos corporales, etc.). Otros factores fisiológicos que pueden influir en la cinética de los fármacos son la edad, el sexo, y circunstancias como la gestación o la lactancia.

Especie: particularidades farmacocinéticas en rumiantes

Cuando se administra un fármaco en los rumiantes se debe tener en cuenta la influencia de los proventrículos en la disposición del fármaco, así como el efecto del fármaco en los componentes de ese "ecosistema" que es el tracto digestivo de los rumiantes. Otro factor que debe considerarse es el impacto de la enfermedad en el complejo engranaje de estos procesos y de qué manera las condiciones patológicas pueden afectar la disposición del fármaco.

Para el paso de un compuesto a la circulación general, a partir de cualquier vía de administración, el mismo debe ser capaz de atravesar las barreras estructurales, a la vez que debe existir un gradiente de concentración entre el punto de administración y el líquido extracelular de la zona. Cuando los fármacos se administran en rumiantes por vía oral para producir un efecto

sistémico, el primer problema que aparece es que el enorme volumen del contenido retículo ruminal produce una gran dilución del fármaco administrado. A su vez, la disposición en fases de la ingesta y el relativamente lento sistema de mezcla del contenido ruminal, causan retrasos en la consecución de concentraciones uniformes a través de las distintas capas del contenido. Los fármacos pueden ser administrados en forma líquida, como soluciones o suspensiones que se mezclan con el alimento o el agua de bebida, o en formas sólidas, como tabletas, bolos, cápsulas o formas especiales de liberación. Cada una de estas formas llegará a distintas zonas del contenido ruminal, lo que conducirá a patrones variables de distribución intraruminal. En general, las formas líquidas llegan al retículo y zonas adyacentes, por lo que una cantidad considerable de fármaco puede pasar a través del orificio retículo-omasal antes de que se produzca la mezcla. Esto permitiría a una parte de la dosis escapar de la degradación ruminal y estar presente más rápidamente en el intestino delgado para su absorción (Dunlop, 1983). En la figura 1.6. se esquematiza este fenómeno, así como un resumen de los procesos que se desarrollan en el tracto gastrointestinal de los rumiantes.

A través del epitelio ruminal se produce la absorción de algunos compuestos, sobre todo de ácidos grasos volátiles y agua. El agua se mueve libremente atravesando la pared ruminal en ambas direcciones dependiendo del gradiente osmótico y, normalmente, se produce absorción neta de agua desde el rumen.

Se ha demostrado que el epitelio ruminal es bidireccionalmente permeable a varias sustancias como acetona, etanol, bicarbonato, salicilato, tiabendazol, efedrina, benzoato, antipirina y ciertas sulfonamidas.

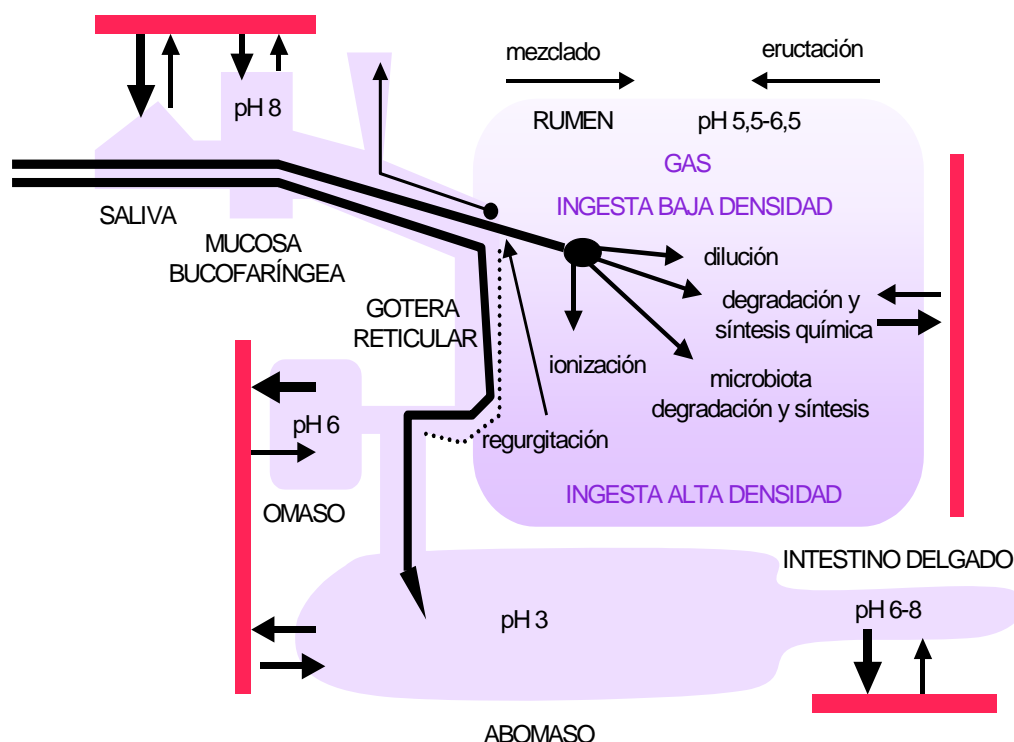


Figura I.6. Esquema de los procesos que tienen lugar en el tracto gastrointestinal de los rumiantes.

Otros compuestos como pectina, cobalto, polietilenglicol, fenolsulfoftaleína y colina, entre otros, no parecen atravesar el epitelio (Jenkins y col., 1975). Los factores físico-químicos relacionados con la absorción de sustancias a través de la pared ruminal son el grado de ionización (en función del pH), el tamaño de las moléculas y el gradiente de concentración. La tasa de absorción desde el rumen depende de la concentración de fármaco en la forma no ionizada, la cual, a su vez, depende de la concentración y pKa del fármaco y del pH del medio ruminal. Cuando los fármacos son administrados por vía intravenosa, puede existir un paso de los mismos a través de la pared ruminal hacia el interior del rumen, que podría dar por resultado amplias variaciones en el volumen de distribución de los fármacos respecto de las especies que poseen estómago monocavitario.

El flujo sanguíneo de la mucosa retículo ruminal es una variable

importante que puede modificar la tasa de absorción. La alimentación produce un fuerte aumento del flujo sanguíneo de la mucosa, mientras que la infusión de adrenalina o noradrenalina lo disminuye. Resulta difícil predecir la absorción ruminal de un fármaco basándose solamente en las curvas de concentraciones ruminales y plasmáticas. En bovinos adultos que presentan motilidad ruminal normal, la semivida de vaciado del retículo-rumen a través del orificio retículo-omasal es de 5 a 7 horas para el componente líquido de la ingesta. Para el componente más grosero o después de periodos de inanición, este tiempo se prolonga notablemente. Un fármaco soluble puede depositarse en retículo y de ahí, parte de la dosis puede pasar rápidamente al omaso, abomaso e intestino delgado. Esto permitiría una rápida absorción y produciría así un rápido incremento en la concentración plasmática. El fármaco restante pasaría al rumen, mezclándose lentamente con la ingesta. Esta porción pasaría al omaso gradualmente, porque se encuentra diluida en el contenido ruminal. Por lo tanto, las curvas de concentraciones de un fármaco deben ser interpretadas cuidadosamente, ya que un aumento en las concentraciones plasmáticas por una absorción intestinal de la porción de fármaco que escapa al rumen puede confundirse con una absorción a nivel ruminal.

Por otro lado, dado que los fármacos que se utilizan con fines terapéuticos suelen ser administrados a animales enfermos, y estos pueden sufrir éstasis ruminal, la farmacocinética de las sustancias administradas por vía oral en los rumiantes puede cambiar drásticamente en los estados de enfermedad. Las concentraciones plasmáticas son, en general, mucho más bajas cuando existe una atonía ruminal, debido a diversos factores, como la reducción en la velocidad de paso hacia el omaso, la reducción en el flujo sanguíneo de la mucosa ruminal, la falta de un mezclado efectivo que permita el contacto correcto del fármaco con la superficie de absorción, la pérdida del movimiento de las papilas, la alteración de la actividad microbiana, el cese de la rumia, cambios en el pH, la temperatura y la osmolaridad del contenido y cambios en la ingesta de alimentos, agua y saliva.

Otro factor a tener en cuenta es el efecto que los fármacos pueden tener sobre la microbiota, así como el efecto de ésta sobre los fármacos. La microbiota del rumen incluye bacterias, protozoos, hongos y levaduras. Existen varios grupos de protozoos que pueden inactivar algunos fármacos a nivel ruminal. Un ejemplo de esto es la inactivación del cloranfenicol por reducción de su grupo nitro a una arilamina (Dunlop, 1983). Las bacterias del rumen se encuentran en tres ambientes diferentes, el líquido ruminal, las partículas sólidas y la superficie epitelial, a donde están adheridas. La reducción de bacterias adheridas se acompaña de una severa disminución de la actividad ureasa de la pared ruminal y las bacterias asociadas con el material sólido componen la flora celulolítica. La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre metabolismo ruminal incluyen muestras de la porción líquida del contenido ruminal, con lo que el panorama del efecto de la microflora sobre los fármacos estaría incompleto. Las bacterias del rumen son capaces de realizar una amplia variedad de transformaciones bioquímicas. Los productos de estas transformaciones pueden tener consecuencias patológicas o afectar los procesos digestivos o nutricionales.

Existen otras reacciones bioquímicas que no involucran directamente a la microflora ruminal. Un ejemplo es la aparición de tiaminasa I en el rumen por su presencia en los alimentos o como enzima formada por las bacterias y que escapa al líquido ruminal. Esto produce en los animales una deficiencia en tiamina que puede traer como consecuencia la presentación de poliencefalomalacia.

Otro factor que puede influir en la farmacocinética en rumiantes es la producción de saliva. La mayor contribución pertenece a la glándula parótida. La saliva es una solución fuertemente tamponada por bicarbonatos y fosfatos a pH 8,2. Esta naturaleza básica de la saliva en los rumiantes es la responsable de la neutralización de los ácidos orgánicos formados en los proventrículos, para lograr el pH ruminal de 5,6-6,5 que es necesario para el mantenimiento de la microflora. La urea presente en la saliva sirve como

fuentes de nitrógeno para la síntesis de proteínas microbianas. La producción total de saliva puede llegar a ser de 100-200 l/día en bovinos y 10 l/día en ovinos. Las particularidades de pH y volumen de la saliva de los rumiantes pueden influir en el comportamiento cinético de algunos fármacos, ya que estos pueden seguir el circuito rumen-sangre-saliva.

Otra particularidad anatómica de los rumiantes que puede influir en la farmacocinética de un compuesto administrado por vía oral es la presencia de la gotera reticular. El momento en el que el mecanismo reflejo de cierre de esta estructura deja de producirse espontáneamente está en relación con el desarrollo del resto de las estructuras digestivas del rumiante que a su vez dependerá de la dieta ingerida, por lo que la edad a la que se produce varía ampliamente, entre las 6 semanas y los 20 meses. Sin embargo, los rumiantes adultos mantienen la capacidad y pueden cerrar la estructura siempre que reciban estímulos específicos. La naturaleza química del alimento puede variar la incidencia del cierre. De esta manera, alimentos ricos en proteínas de leche, soja y pescado y los componentes del suero de leche pueden favorecer el reflejo. La naturaleza física (líquido/sólido) y el mecanismo de administración de los alimentos también pueden influir (la succión de líquidos favorece el cierre). La sed, el apetito y reflejos condicionados también actúan a este nivel, así como la administración de compuestos que contengan sales de sodio o cobre, entre otras (San Andrés, 1992; Encinas, 1993).

Todas estas características propias de los rumiantes pueden llevar a diferencias en el comportamiento cinético de los fármacos respecto de otras especies.

Por otro lado, también se han observado diferencias en la disposición de los fármacos entre las distintas especies de rumiantes.

Se han registrado diferencias en la absorción de fármacos administrados por vía oral entre cabras y ovejas (Bogan y col., 1987; Hennessy y col.,

1993a, 1993b), observándose una menor tasa de paso de la ingesta líquida a través del rumen de las cabras. Este flujo reducido podría retener los fármacos en el rumen y retrasar la absorción en sitios distales.

Las diferencias en la afinidad de los fármacos a proteínas plasmáticas de distintos rumiantes ha sido descrita. Para las quinolonas, Bregante y col. (1999, 2000), señalan la diferente unión de enrofloxacin en vacas y ovejas.

También se han citado diferencias en la eliminación entre vacas, ovejas y cabras, siendo las cabras las que eliminan más rápidamente la mayoría de los compuestos. Esto sucede, sobre todo, con aquellos compuestos que sufren metabolismo extenso, registrándose, en esta especie, una mayor concentración y actividad del citocromo P-450 y de la mayoría de las enzimas microsomales y citosólicas de hígado y pulmón (Eltom y col., 1993a; Hennessy y col., 1993b; Elsheikh, 1997). Tanto las rutas metabólicas, como la intensidad de los procesos y el número de metabolitos originados puede variar de unas especies a otras. Se han observado diferencias entre los rumiantes en la eliminación de numerosos fármacos, como por ejemplo el febantel, la antipirina, la sulfadimidina, el clorsulón, la ampicilina, la oxitetraciclina, la fenilbutazona, el oxfendazol, closantel y la amoxicilina-ácido clavulánico (DelaTour y col., 1985; Elsheikh y col., 1997; Sundolf y Whitlock, 1992; Eltom y col., 1993b; Hennessy y col., 1993a, 1993b; Carceles y col., 1995).

Grado de desarrollo

El comportamiento cinético de los fármacos puede verse afectado por una serie de factores que dependen de la edad. El desarrollo postnatal, así como los cambios relacionados con el envejecimiento pueden influir en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos.

El grado de desarrollo anatómico, el área de absorción de la mucosa gastrointestinal, el flujo sanguíneo regional, el pH gástrico, la motilidad gastrointestinal, la población microbiana y la alimentación de los neonatos,

son los factores que más influyen en el proceso de absorción oral. El complejo desarrollo postnatal del tracto gastrointestinal de los rumiantes hace que, en estas especies, exista una gran diferencia en la absorción de los fármacos entre los neonatos y los adultos. Desde el punto de vista anatómico, al nacimiento, tanto en cabritos, como en terneros o corderos, se encuentran presentes todas las estructuras del tracto digestivo de los rumiantes adultos, aunque en estado juvenil. Los proventrículos son relativamente afuncionales y están menos desarrollados en comparación con el abomaso. El rumen presenta la tasa de crecimiento más rápida, seguida por retículo, omaso y abomaso, en este orden. En cabras, el rumen tiene un volumen de 70 ml al nacimiento y la relación con el volumen del abomaso es 1/4. A las 6 semanas esta relación es 5,7/1 (Smith y Sherman, 1994). Alrededor de las doce semanas de vida, en cabritos y terneros, la proporción relativa de las cuatro estructuras alcanza los valores del adulto, mientras que, en corderos, esto se produce a las ocho semanas (De Backer y Bogaert, 1983; Smith y Sherman, 1994). El desarrollo funcional del rumen ha sido dividido en tres periodos: la fase no rumiante, hasta la tercera semana de edad, la fase de transición, entre las tres y las ocho semanas y la fase adulta, desde las ocho semanas. Así, una función ruminal equivalente a la de un adulto se obtendría a partir de las 8 a 12 semanas, aproximadamente. También se han encontrado diferencias en el proceso de desarrollo anatómico retículo ruminal entre terneros alimentados con leche y terneros alimentados con forraje. El aumento de volumen del rumen conlleva un aumento de la superficie de absorción por el desarrollo de las papilas. En terneros recién nacidos, las papilas rumino reticulares miden menos de 1 mm, pero con la ingestión de alimento sólido alcanzan el tamaño del adulto en ocho semanas. El desarrollo de las papilas, con su respectivo aporte sanguíneo y linfático, aumenta considerablemente la absorción de sustancias a este nivel. A su vez, en las primeras semanas de vida, se produce un aumento importante del flujo sanguíneo de las venas ruminales y de la vena porta, lo que favorece la velocidad de absorción (De Backer y Bogaert, 1983).

Los cambios en el pH del tracto gastrointestinal afectan la difusión no

iónica de ciertos fármacos. En animales adultos, el pH ruminal se encuentra entre 5,6 y 6,5, mientras que terneros de tres semanas de edad presentan un pH rumino reticular de 6-8. El pH abomasal es de 7,5 al nacimiento, pero desciende a 4 en sólo unas horas con la ingestión de calostro o leche. Durante las siguientes dos semanas, con el aumento de actividad de la pepsina el pH desciende a 2 con aumentos temporales durante la ingestión de sustitutos lácteos. Al ir cambiando a una dieta sólida, el pH promedio del abomaso pasa a ser de 3,6, mientras que el pH abomasal del adulto es de 2-3 (De Backer, 1986; Gürtler y col., 1987; Leek, 1999).

Otro determinante del proceso de absorción de los fármacos es el desarrollo de la motilidad gastrointestinal. En los rumiantes, es de fundamental importancia la motilidad retículo ruminal. En terneros, no se registran movimientos de los preestómagos durante las dos primeras semanas de vida. A las tres semanas comienza a apreciarse un leve movimiento del retículo seguido por un lento movimiento del rumen. A las seis semanas, y sólo en los terneros alimentados con forraje, se aprecia la contracción bifásica del retículo y un fuerte movimiento ruminal (De Backer y Bogaert, 1983). Esta falta de actividad propulsiva en el neonato afecta el tránsito de los fármacos administrados por vía oral y produce un retraso en la absorción de los mismos.

Mientras que la actividad funcional retículo ruminal requiere de varias semanas para alcanzar el desarrollo completo, en corderos, se ha observado un patrón adulto de actividad motora en el intestino delgado ya en el momento de nacer (De Backer, 1986). En otras especies, como por ejemplo en perros, durante las primeras semanas de vida, se observa un patrón fetal de actividad propulsiva en el intestino.

El establecimiento de la población microbiana en los proventrículos durante las primeras semanas de desarrollo postnatal, puede también influir en la absorción. Algunos fármacos pueden ser metabolizados por la flora intestinal y, por otro lado, la escasez de aceptores de hidrógeno, debida a las

fermentaciones anaeróbicas en el rumen, puede favorecer la reducción de las sustancias administradas por vía oral. Todo esto daría como resultado una importante eliminación presistémica de los fármacos. En este sentido, se encontró que a medida que los rumiantes jóvenes van adquiriendo la población microbiana de los proventrículos, la biodisponibilidad oral de algunos fármacos va disminuyendo paralelamente, como sucede con el cloranfenicol y el trimetoprim (De Backer, 1986). Esto mismo sucede con el desarrollo de sistemas enzimáticos de la mucosa gastrointestinal y del hígado que suelen ser deficientes en el neonato. El desarrollo del metabolismo hepático puede ser responsable de una disminución aparente en la absorción de los fármacos con la edad (Short y Clarke, 1984).

Por último, la edad puede condicionar la dieta ingerida y de esta manera influir en la absorción oral de algunos fármacos. En terneros, se observó una disminución de la biodisponibilidad de tetraciclinas, penicilinas, cloranfenicol y trimetoprim, tras una alimentación láctea. Para el caso de las quinolonas, esto puede ocurrir, debido a la quelación con cationes multivalentes, como el calcio contenido en la leche y los sustitutos lácteos.

La evolución postnatal en la composición del organismo puede llevar a importantes variaciones en la distribución de los fármacos. El volumen de distribución depende, entre otros factores, de la proporción de agua corporal, de la cantidad de tejido adiposo, de la unión a proteínas plasmáticas y tisulares, del gasto cardíaco y flujo sanguíneo regional, de la permeabilidad de ciertas barreras y, en el caso de los rumiantes, del grado de desarrollo de los proventrículos.

En la mayoría de los mamíferos, la proporción de agua es más alta en el neonato que en el adulto, por lo que los fármacos más hidrosolubles y que presentan una baja tasa de unión a proteínas plasmáticas, tendrán un volumen de distribución mayor en los neonatos. Esto, sin embargo, no es tan claro para fármacos poco polares (liposolubles) como las quinolonas (De

Backer, 1986). El agua corporal total representa entre un 70 a un 75 % del peso corporal en el neonato, mientras que en el adulto es sólo un 50 a 60 %. En algunas especies, el volumen del líquido extracelular en el recién nacido es casi el doble que en el adulto (Short y Clarke, 1984). La proporción de tejido graso en los animales jóvenes es menor que en los adultos (Fraile y col., 1993), lo que puede influir en la distribución de fármacos liposolubles.

La unión de los fármacos a las proteínas del plasma está en función de la cantidad de proteínas disponibles, de la afinidad del fármaco por estas proteínas, del número de sitios de unión disponibles y de la presencia de condiciones fisio o patológicas que pueden alterar esta interacción (Eltom y col., 1993b). La concentración de proteínas plasmáticas en el recién nacido suele ser baja, fundamentalmente la fracción de albúminas; por ello, en neonatos, podría observarse una menor unión a proteínas, y, en consecuencia, un mayor volumen de distribución, sobre todo de aquellos fármacos que usualmente presentan una tasa alta de unión (De Backer, 1986). Durante el desarrollo postnatal, la concentración de albúmina en plasma está en función de la maduración de los hepatocitos. La habilidad del hígado fetal para sintetizar proteínas varía considerablemente con las especies. La concentración de albúmina en plasma de cabras, ovejas, vacas, perros y seres humanos es sólo ligeramente menor al nacimiento que en el adulto. Sin embargo, el cerdo es excepcionalmente hipoalbuminémico al nacer (Short y Clarke, 1984). La unión a proteínas plasmáticas en el neonato puede, también, verse influenciada por la presencia de albúmina fetal o una alta concentración de ácidos grasos libres y de bilirrubina que son posibles competidores endógenos de los fármacos por la unión a la albúmina en los neonatos.

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica es mayor en el neonato, por lo que fármacos que normalmente la atraviesan en pequeña medida, pueden atravesarla con más facilidad.

En rumiantes, la diferencia en el volumen de los proventrículos, debida

al distinto grado de desarrollo de los mismos según la edad, es otro factor que puede modificar ampliamente el volumen de distribución de las quinolonas.

La excreción de los fármacos puede verse influida, entre otras cosas, por el grado de madurez renal al nacimiento. La función renal en los mamíferos recién nacidos no está completamente desarrollada, lo que puede llevar a una reducción de la excreción renal de los fármacos. El grado de maduración de la función renal al momento de nacer varía de acuerdo a las especies. Los rumiantes poseen una función renal mucho más desarrollada al nacimiento que la de otros mamíferos. Por otro lado, la tasa de maduración postnatal de la función renal también puede variar considerablemente de una especie a otra. El desarrollo de la filtración glomerular tras el nacimiento se produce muy rápidamente en los rumiantes, completándose en sólo uno a tres días. En cerdos y en el ser humano, este proceso lleva de una a dos semanas, mientras que en perros o roedores, el desarrollo completo de la función de filtración se alcanza más tardíamente, entre la segunda y la tercera semana de vida. Como resultado, el aclaramiento de fármacos que se eliminan principalmente por filtración glomerular alcanza valores de adultos en los primeros días de vida en los rumiantes y en las primeras semanas en la mayoría de los mamíferos. El desarrollo de la función de secreción tubular también puede influenciar la eliminación de ciertos fármacos. En los terneros, la función de secreción tubular está completamente desarrollada uno a tres días después del nacimiento, mientras que en ovejas y cabras se alcanza el desarrollo completo en una a dos semanas. En seres humanos la maduración de los procesos de secreción tubular es mucho más lenta y requiere más de veinte semanas, mientras que cerdos, perros y roedores presentan valores intermedios (cuatro a ocho semanas) (De Backer, 1986). Los mecanismos de reabsorción tubular se desarrollan muy tempranamente en cabras.

Cambios en la dieta relacionados con la edad (por ejemplo, en animales en crecimiento, el cambio de una dieta láctea a la dieta de adultos) traen aparejados cambios en el pH urinario que pueden alterar la eliminación renal

de los fármacos. En los rumiantes, la alimentación varía, progresivamente, desde una dieta exclusivamente láctea, que produce valores de pH urinario ligeramente ácido, a una dieta a base de forraje y pienso en los adultos, que produce una orina netamente alcalina. La reabsorción tubular pH dependiente ha sido demostrada para la mayoría de las quinolonas (Sörgel y Kinzig, 1993), por lo que dichas variaciones de pH pueden modificar la eliminación de las mismas.

La velocidad de maduración de la función hepática no es igual para todas las especies y varía, a su vez, dentro de una misma especie, en función del fármaco y la ruta metabólica en cuestión. En los neonatos, la actividad metabólica es, generalmente, baja. El desarrollo de la actividad metabólica hepática se alcanza entre la primera y la segunda semana en el caballo y entre la primera y la tercera en roedores. En el perro y los rumiantes el proceso lleva entre tres y cinco semanas y en cerdos y seres humanos es más prolongado (cuatro a doce semanas). En general, en el momento del nacimiento, el sistema oxidasa dependiente del citocromo P-450 y el sistema de conjugación con ácido glucurónico son deficientes en los mamíferos. Sin embargo, otros pasos metabólicos, como la acetilación, conjugación con glicina o sulfato, están desarrollados en los neonatos. En algunos pasos metabólicos como la desalquilación, la actividad puede sobrepasar a la de los adultos en algunos estadios de la evolución de los mamíferos (De Backer, 1986).

Numerosos autores han estudiado la influencia del desarrollo en la farmacocinética de las quinolonas en diversas especies domésticas, encontrándose, en algunos casos, diferencias significativas en algunos parámetros farmacocinéticos entre los grupos de distintas edades (Mevius y col., 1990; Tagawa y col., 1994; Gips y Soback., 1996; Fraile y col., 1997; González y col., 1997; Kaartinen y col., 1997b; Yoshida y col., 1998).

Ha sido demostrado que diversas fluoroquinolonas pueden inducir alteraciones en el cartílago articular de animales jóvenes o en crecimiento (McKellar, 1996). Por tanto, los regímenes posológicos no deberían ser extrapolados, incluso desde la información proveniente de animales adultos de

la misma especie (Gaur y col., 2004).

En el caso de la administración de **marbofloxacin** en animales jóvenes, Thomas y col. (1994b) encontraron que la capacidad de eliminación es menor en terneros prerrumiantes de tres semanas que en los animales adultos, aumentando el aclaramiento de 0,15 a 0,31 l/h·kg durante el periodo estudiado.

Sexo

El estudio de la farmacocinética de la prulifloxacin en ratas no mostró diferencias relacionadas con el sexo (Okuyama y col., 1997), las cuales tampoco se observaron tras la administración de balofloxacin (Nakagawa y col., 1995). Por otro lado, estudios sobre la influencia del sexo en la farmacocinética de la grepafloxacin en seres humanos dieron como resultado diferencias significativas en el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo (ABC), la concentración máxima alcanzada (C_{max}), el volumen de distribución (Vd) y el aclaramiento plasmático (Cl), mientras que no se encontraron diferencias en la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$). Estudios posteriores demostraron que se debieron, principalmente, a las diferencias en el peso corporal, particularmente en la proporción de tejido corporal magro, concluyéndose que el sexo no tiene influencia significativa en la farmacocinética de la grepafloxacin (Efthymiopoulos, 1997). Hallazgos similares fueron descritos por Granneman y Guay (1991) tras la administración de temafloxacin en hombres y mujeres. En este estudio, las diferencias en el comportamiento farmacocinético atribuibles al género fueron mínimas y desaparecieron cuando los datos fueron relacionados con la superficie corporal. De igual modo, la cinética de la amifloxacin no presentó diferencias significativas entre los individuos de distinto sexo que no pudieran ser atribuidas a diferencias en el peso corporal (Stroshane y col., 1990).

Lactación

Las fluoroquinolonas penetran en la glándula mamaria y llegan a encontrarse en leche en altas concentraciones.

La relación leche/plasma, determinada por el cociente $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$ para la enrofloxacin y la ciprofloxacina administrada a conejas en lactación fue de 2,59 y 3,61, respectivamente, lo cual indica la acumulación de estas quinolonas en la leche (Aramayona y col., 1996). De la misma manera, tras la administración parenteral de enrofloxacin en vacas en lactación, se observa que su principal metabolito, la ciprofloxacina, se acumula y persiste en la glándula mamaria (Walser y col., 1993; Kaartinen y col., 1995; Malbe y col., 1996). La penetración de danofloxacin desde la sangre a la leche de vacas tras la administración intravenosa e intramuscular fue rápida y extensa, encontrándose concentraciones del fármaco en leche que superan a las concentraciones plasmáticas a partir de los 90 y 120 minutos después de la administración (IV e IM respectivamente) (Shem Tov y col., 1998). Resultados similares se encontraron con esta misma quinolona en ovejas, hallándose concentraciones en leche que superan a las del plasma desde los 60 minutos de la administración i.v. y los 90 minutos de la administración i.m. (Shem Tov y col., 1997b). En esta especie, se estudió la farmacocinética de la norfloxacina durante la lactación y un mes después del destete, encontrándose una mayor tasa de aclaramiento y una menor semivida de eliminación y tiempo medio de residencia en los animales en lactación, aunque no se encontraron modificaciones en el volumen de distribución (Soback y col., 1994). La sparfloxacina, administrada oralmente a ratas en lactación, alcanza niveles en leche altamente superiores a los niveles plasmáticos (Matsunaga y col., 1991).

Para el caso de la **marbofloxacina**, se ha observado una amplia penetración desde el plasma a la leche de vacas y ovejas y una acumulación del fármaco en la glándula mamaria con valores de $ABC_{\text{leche}}/ABC_{\text{plasma}}$ que se

encuentran entre 1,33 y 2,64 (Shem Tov y col., 1997a). Petracca y col. (1993) encontraron que las concentraciones en leche de cerdas resultaron mayores a las concentraciones plasmáticas en todos los puntos, ya que, debido a su alta lipofilicidad, penetra en la glándula mamaria y se acumula en leche.

Todos estos resultados sugieren que el proceso de lactación puede afectar el comportamiento farmacocinético de las quinolonas.

Factores patológicos

Enfermedad renal

La eliminación renal es una de las principales vías de eliminación de la mayoría de las quinolonas. Aunque las alteraciones renales afectan, principalmente, la excreción de los fármacos, también pueden producirse alteraciones en la absorción, distribución y metabolismo. Los vómitos y diarreas que se pueden producir como consecuencia de una insuficiencia renal, pueden reducir la absorción de los fármacos por vía oral. En los enfermos renales hay alteraciones funcionales de la albúmina, acidosis, aumento de competidores (ácidos grasos) e hipoalbuminemia (Armijo, 1997). Estas alteraciones afectan de forma más significativa a aquellas quinolonas que se unen a la albúmina en una alta proporción. La unión de los fármacos básicos a la α_1 -glicoproteína y a las lipoproteínas puede estar aumentada en los enfermos renales, ya que sus niveles pueden estar incrementados en la enfermedad renal crónica. Además, la urea, en concentraciones patológicas, disminuye la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas, lo cual puede disminuir el volumen de distribución. Los edemas, que pueden estar presentes en la insuficiencia renal, también pueden modificar la distribución de los fármacos.

En cuanto a los procesos metabólicos durante la enfermedad renal, en el hígado pueden disminuir los fenómenos de acetilación y de reducción, pero

no suelen afectarse los procesos oxidativos, la glucuronidación, la sulfatación ni la O-metilación.

El fallo renal afecta principalmente a aquellas quinolonas que se excretan preferentemente por la orina en forma inalterada, como es el caso de la **marbofloxacina**. En enfermos renales, la semivida de eliminación de las quinolonas se prolonga en relación al grado en que cada compuesto es eliminado normalmente por vía renal. Se observó que la farmacocinética de la lomefloxacina es dependiente de la función renal y que existe una correlación lineal entre el aclaramiento de creatinina y el aclaramiento plasmático y renal del fármaco (Blum y col., 1990; Nilsen y col., 1992). La correlación entre el aclaramiento de creatinina y el aclaramiento plasmático y renal de los fármacos ha sido descrita para otras quinolonas, como la temafloxacina (Granneman y col., 1991), la enoxacina (Van der Auwera y col., 1990), la sparfloxacina (Fillastre y col., 1994), la balofloxacina (Kozawa y col., 1996), la norfloxacina, la ciprofloxacina (Blum, 1992), la ofloxacina o la levofloxacina (Nicolle, 1999), entre otras.

En el caso de la **marbofloxacina**, la inducción experimental de un fallo renal moderado en perros, produjo sólo una leve acumulación del fármaco en el organismo que no resultó biológicamente relevante (Lefebvre y col., 1998). Los autores sugieren que la ausencia del efecto del fallo renal moderado sobre la farmacocinética de la marbofloxacina podría deberse a un aumento en la eliminación a través de metabolismo hepático.

Enfermedad hepática

La enfermedad hepática no altera los procesos de absorción, pero la biodisponibilidad oral de los fármacos que sufren metabolismo de primer paso en el hígado, puede verse aumentada, ya que la disminución del metabolismo permite que llegue más fármaco a la circulación sistémica.

En los enfermos hepáticos puede haber una disminución en la cantidad de grasa del organismo que reduzca el volumen de distribución de los

fármacos liposolubles y un aumento del contenido hídrico que aumente el volumen de distribución de los fármacos hidrosolubles, sobre todo en el caso de producirse una hipertensión portal que genere ascites. Sin embargo, las principales alteraciones en el volumen de distribución se deben a la disminución en la unión a las proteínas del plasma debido a la existencia de hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia y disminución de la α_1 -glicoproteína ácida, lo cual lleva a un aumento del volumen de distribución. Es más frecuente observar alteraciones en la unión a proteínas en los procesos crónicos, como la cirrosis, que en los agudos.

La excreción biliar de los fármacos no suele estar alterada en la enfermedad hepatocelular, excepto cuando hay colestasis de origen hepático. Para el caso de la pefloxacin o la trovafloxacin, que se eliminan en grandes cantidades por bilis, la importancia de la colestasis es mayor y pueden ser necesarios ajustes en las dosis. Por el contrario, en el caso de quinolonas que se eliminan principalmente por vía renal, como la ofloxacina, la relevancia es menor.

La cirrosis hepática se acompaña de alteraciones en la función renal que producen retención de sodio y agua y pueden reducir el aclaramiento de algunos fármacos. Orlando y col. (1992) encontraron una disminución del aclaramiento renal de ofloxacina en pacientes con cirrosis hepática compensada, a pesar de que estos pacientes presentaban una función renal aparentemente normal.

Enfermedad cardiovascular

La disminución del flujo sanguíneo y de la motilidad intestinal producidas por el aumento de tono simpático en enfermedades cardiovasculares, pueden reducir la velocidad de absorción de algunos fármacos. Tras la administración intramuscular y subcutánea la absorción también puede verse reducida por el mismo mecanismo.

El aumento del tono simpático también reduce el flujo sanguíneo de ciertos territorios orgánicos como la piel y el área esplácnica, con lo que el volumen de distribución de algunos fármacos puede verse disminuido. Por otro lado, los edemas que se producen como consecuencia de una enfermedad cardiovascular, pueden aumentar el volumen de distribución de los fármacos hidrosolubles

La disminución del gasto cardíaco reduce el flujo sanguíneo renal y produce una insuficiencia de tipo prerrenal, y, de esa manera, la eliminación de los fármacos que se excretan preferentemente por vía renal puede verse disminuida. En la insuficiencia cardíaca hay, también, una disminución del flujo sanguíneo hepático del 20-40 %, que reduce el metabolismo de los fármacos dependientes del flujo sanguíneo hepático (fármacos con alta tasa de extracción). Además, la congestión hepática, la hipoxemia y la acidosis disminuyen el metabolismo de los fármacos dependientes de la capacidad metabólica. La alteración simultánea de la excreción renal y hepática produce una disminución en el aclaramiento de todos los fármacos.

Endotoxemia

La endotoxina bacteriana, que es uno de los principales componentes de la membrana externa de las bacterias gram negativas, juega un papel importante en la patogenicidad de la sepsis, el shock séptico y el fallo orgánico múltiple y es uno de los factores responsables de la alta mortalidad en los casos de infecciones por bacterias gram negativas. (Hasegawa y col., 1999).

Dentro de los factores que pueden modificar la absorción de los fármacos, en la endotoxemia se ha observado una alteración de la función gástrica con inhibición de la motilidad y cambios en el flujo sanguíneo de los órganos del tracto gastrointestinal (Van Miert, 1990). La fiebre inhibe el vaciado gástrico en animales que poseen estómago monocavitario y produce

éstasis retículo ruminal en los rumiantes (Baggot, 1980). La disminución en la tasa de vaciado gástrico puede producir una reducción en la tasa de absorción en los animales febriles. Los cambios en el flujo sanguíneo junto con la disminución de la capacidad metabólica del hígado podrían contribuir a alterar tanto la absorción de fármacos administrados por vía oral, como la distribución y el grado de metabolismo.

Por otro lado, se ha descrito que la endotoxina produce un aumento de la permeabilidad intestinal, lo cual sugiere que la exposición a la endotoxina puede causar alteración de la barrera mucosa gastrointestinal (O'Dwyer y col., 1988). También se ha observado un aumento de pH gástrico que puede alterar la solubilidad y, consecuentemente, la absorción de algunos fármacos y episodios de diarrea acuosa que causan un profundo efecto negativo en la biodisponibilidad oral (Van Miert, 1990).

La respuesta de fase aguda se caracteriza por una hipoalbuminemia y síntesis hepática de proteínas de fase aguda, como la glicoproteína ácida α_1 , a la cual se unen, mayoritariamente, fármacos con características básicas. Así, la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas puede verse modificada por alteración de la cantidad de proteínas disponibles, pero también por una variación en la afinidad de los fármacos por las proteínas (Baggot, 1980, Van Miert, 1990).

La endotoxina reduce tanto el contenido, como la actividad de las enzimas que metabolizan los fármacos del citocromo P-450 hepático y, por tanto, la eliminación de los fármacos que son ampliamente metabolizados en el hígado puede verse disminuida. Hasegawa y col. (1999) sugieren que la disminución del metabolismo estaría causada por una supresión en la traslación de proteínas y transcripción del ARNm de las isoenzimas del citocromo P-450.

Por otro lado, la endotoxina induce efectos tóxicos y adversos en los riñones y causa una serie de cambios funcionales que incluyen disminución del flujo plasmático renal, de la tasa de filtración glomerular y de la presión

sanguínea. El efecto sobre la función renal inducido por la endotoxina se produce rápidamente y, probablemente, es reversible, ya que los valores de filtración glomerular retornan a la normalidad 24 horas después de la administración de endotoxina y no se encuentran cambios histopatológicos en el riñón tras la administración en ratas de 250 µg/kg de endotoxina de *Klebsiella pneumoniae* (Hasegawa y col., 1999).

Se cree que la endotoxina no afecta directamente el riñón, sino que sus efectos estarían mediados por moléculas liberadas como consecuencia de la endotoxemia, como citocinas, metabolitos del ácido araquidónico, factor activador de plaquetas, factor de necrosis tumoral- α , y otros (Hasegawa y col., 1999).

La endotoxina puede también alterar la unión a proteínas plasmáticas de algunos compuestos y, por lo tanto, modificar, no sólo el volumen de distribución, sino también la eliminación renal de los fármacos, principalmente el de aquellos que normalmente presentan una alta tasa de unión a proteínas.

Como ejemplos del descenso en el aclaramiento de los fármacos debido a los efectos de la endotoxina sobre la eliminación hepática y renal se pueden citar los observados tras la administración de imidocarb y norfloxacin en cabras (Salam Abdullah y Baggot., 1986) y de cefuroxima en terneros (Chaundhary y col., 1999).

II – JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La actividad agropecuaria ocupa un lugar destacado dentro de la estructura económica de la República Argentina y, dentro de ella, la producción bovina es una de las principales.

Datos estadísticos revelaron que, a marzo de 2008, la existencia bovina en dicho país alcanzó los 57.583.000 cabezas (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2008).

La exportación de carne vacuna con hueso entre el año 2000 y 2004 ha tenido un incremento de 342.000 a 632.000 toneladas, ocupando dentro del Mercado Común del Sur (MERCOSUR) el segundo lugar como exportador, detrás de Brasil. Este dato no es menor si se considera que este Mercado tiene una participación en el plano internacional del 23% y 42% como productor y abastecedor de carne vacuna, respectivamente (Dirección de Mercados Agroalimentarios, 2005).

En lo referente a la producción de leche y derivados, se ha determinado que, en el año 2006, las usinas lácteas recibieron alrededor de 5.795 millones de litros, mientras que en el mismo año se exportaron 360.550 toneladas de productos lácteos (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2009).

La creciente demanda de alimentos de calidad a nivel mundial y la crianza o engorde en explotaciones semi-intensivas o intensivas que persiguen el objetivo de incrementar los niveles productivos, representan una exigencia que somete a los animales de productores de alimentos a situaciones de estrés, las cuales a su vez, contribuyen al desarrollo de patologías infecciosas y/o parasitarias.

El conocimiento amplio y profundo de la eficacia y seguridad de los antibacterianos utilizados en la producción ganadera conducirá a su uso racional, facilitando el control o erradicación de las enfermedades infecciosas, asegurando el bienestar animal, evitando la presencia de fármacos o sus metabolitos en alimentos procedentes de animales tratados y protegiendo el medio ambiente de la contaminación por residuos farmacológicos. Además, se

reducirá notablemente la emergencia de nuevas resistencias bacterianas y el peligro de transmisión horizontal entre las diferentes especies animales, incluido el hombre.

Una de las variables que han sido estudiadas en el área de la farmacología de los antimicrobianos de uso veterinario, es la influencia de la maduración fisiológica sobre el comportamiento farmacocinético. Numerosos autores demostraron que la disposición cinética de ciertos antimicrobianos es diferente entre animales maduros e inmaduros. Sobre los antimicrobianos fluoroquinolónicos en particular, y especialmente en especies rumiantes, se han realizado diferentes estudios sobre este tópico (González y col., 1997, Kaartinen y col., 1997b, Waxman y col., 2004).

Durante las últimas décadas, el interés por la relación entre la farmacocinética (PK) y la farmacodinamia (PD) se ha incrementado (Mouton y col., 2002). El diseño de esquemas de dosificación de antimicrobianos depende de la asociación que exista entre la farmacocinética y datos farmacodinámicos generados *in vivo* o *ex vivo* en modelos animales o ensayos clínicos (Shojaee Aliabadi y col., 2003).

Las marbofloxacin es un antimicrobiano de uso veterinario perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas. Está indicado para bovinos, porcinos, caninos y felinos. Las características farmacocinéticas que presenta en diversas especies permiten la administración por distintas vías con una buena biodisponibilidad, una amplia distribución tisular y una prolongada permanencia en el organismo, que la hacen apta para el tratamiento de afecciones del tracto digestivo, respiratorio, urinario, genital y de la glándula mamaria, entre otras. Presenta actividad contra diversos patógenos de interés veterinario, que incluyen la mayoría de los gérmenes Gram negativos, algunos Gram positivos como por ejemplo estafilococos, y algunas cepas de micoplasmas (Shojaee Aliabadi y col., 2002).

El objetivo general de este trabajo es definir el comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en bovinos de diferentes edades y la

determinación de parámetros PK/PD en mastitis producidas por patógenos locales. Para lograrlo se establecieron los siguientes objetivos particulares:

1- Estudiar los posibles efectos del desarrollo en el comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en bovinos.

1.1.- Estudiar el comportamiento cinético de la marbofloxacin en terneros recién nacidos (<3 días) tras administración endovenosa y oral.

1.2.- Estudiar el comportamiento cinético de la marbofloxacin en terneros de 10 días tras administración endovenosa y oral.

1.3.- Estudiar el comportamiento cinético de la marbofloxacin en terneros de 50 días tras administración endovenosa y oral.

2- Describir la farmacocinética de marbofloxacin en plasma y leche de vacas lecheras en producción, tras la administración endovenosa, intramuscular e intramamaria.

3.- Establecer las CIM de marbofloxacin frente a cepas de *Staphylococcus aureus* productores de mastitis en la cuenca lechera santafesina, y determinar predictores de eficacia PK/PD para estos microorganismos.

Para el establecimiento de estos objetivos se partió de las siguientes hipótesis:

1- Las diferencias que se han observado en la distribución y eliminación de numerosas fluoroquinolonas en distintas especies en función del grado de desarrollo de los animales podrían producirse con la administración de marbofloxacin en bovinos y hacer necesario un ajuste de la dosis en los animales jóvenes para evitar la producción de efectos tóxicos por sobredosificación o la aparición de resistencias por subdosificación.

2- El conocimiento de las características farmacocinéticas que presenta la marbofloxacin en bovinos la convierten en una buena alternativa terapéutica para numerosas patologías infecciosas. El estudio del patrón de excreción láctea luego de la utilización de diferentes vías de administración y su correlación con las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) actuales frente a cepas locales de un patógeno común de la mastitis bovina puede aportar conocimientos acerca de la utilidad del antimicrobiano en esta patología.

III – MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

Animales

Se utilizaron veintiséis (26) terneras y diecisiete (17) vacas de raza Holando Argentino. Los estudios en terneras se realizaron cuando los animales tenían entre 16 y 40 horas de vida, y luego a los diez y cincuenta días de nacidas. Las vacas utilizadas tenían entre 3 y 6 años de edad y se encontraban entre la 1ª y 3ª lactancia. La identificación y pesos individuales, promedio y desvío estándar de los animales experimentales se muestran en las Tabla III-1-a y b.

Tabla III-1-a: Identificación y peso de los animales experimentales: Terneras.

Nº	IDENTIFIC.	TERNEROS					
		Peso (kg)					
		I.V. Neonatos	Oral Neonatos	I.V. 10 días	Oral 10 días	I.V. 50 días	Oral 50 días
1	2601	38	-	39	-	55	-
2	2602	32	-	37	-	50	-
3	2603	38	-	38	-	-	-
4	6	46	-	46	-	-	-
5	2655	39	-	-	-	47	-
6	2656	39	-	-	-	62	-
7	17	-	40	-	50	-	-
8	18	-	40	-	45	-	-
9	3204	-	43	-	50	-	-
10	3203	-	40	-	40	-	-
11	21	-	30	-	40	-	-
12	22	-	40	-	40	-	-
13	2600	-	-	39	-	62	-
14	4	-	-	41	-	58	-
15	2604	-	-	-	-	-	47
16	2605	-	-	-	-	-	55
17	2606	-	-	-	-	-	50
18	2609	-	-	-	-	-	44
19	2608	-	-	-	-	-	55
20	2631	-	-	-	-	-	71
21	2629	-	-	-	-	-	54
22	2630	-	-	-	-	-	60
23	2640	-	-	-	-	-	66
24	2641	-	-	-	-	-	50
25	2642	-	-	-	-	-	54
26	2643	-	-	-	-	-	55
Media		38,6	38,8	40,0	44,1	55,6	55,0
D.E.		4,4	4,4	3,2	4,9	6,2	7,6

Tabla III-1-b: Identificación y peso de los animales experimentales: Vacas.

Nº	IDENTIFICACIÓN	Nº LACTANCIAS	Peso (kg)		
			I.V.	I.M.	I.Mam.
1	3272	3	631	-	-
2	2896	5	692	-	-
3	2615	5	-	703	-
4	3264	3	628	-	-
5	3171	4	677	698	-
6	2908	5	626	-	-
7	3183	4	571	-	-
8	3168	4	-	617	-
9	23520	3	-	773	-
10	3144	4	-	625	-
11	60	5	-	705	-
12	4237	3	-	-	600
13	4342	4	-	-	500
14	4178	4	-	-	545
15	3626	3	-	-	585
16	4380	4	-	-	500
17	4330	5	-	-	560
Media			637,5	683,6	548,3
D.E.			42,9	64,2	42,0

La utilización de los animales experimentales fue aprobada por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Las pautas de utilización de los animales se resumen en el punto III.2.2.

Cepas bacterianas

Cepa control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Cepas de campo de *Staphylococcus aureus*.

Fármacos

Como sustancias patrón para los análisis cromatográficos y determinación de concentraciones inhibitorias mínimas se emplearon la marbofloxacin (MFX), suministrada como producto puro por el laboratorio de

especialidades veterinarias Vetoquinol (Lure, Francia, lote 53596) y la ofloxacin (Sigma Chemical CO, lote 58H0572) como patrón interno.

Las especialidades farmacéuticas a base de marbofloxacin utilizadas para los ensayos farmacocinéticos fueron Marbocyl® 10% solución inyectable (Vetoquinol, lote 32723) y Marbocyl® bolus (Vetoquinol, lote 05A11).

Para la obtención del plasma las muestras de sangre fueron extraídas con jeringas previamente heparinizadas (heparina sódica 5%, Laboratorio LEO).

Ningún otro fármaco fue administrado a los animales durante el tiempo que duró la experiencia.

Material utilizado durante la toma de muestras y en las metodologías de análisis.

Acetonitrilo calidad HPLC (Scharlau Chemie S.A.).

Ácido acético glacial para análisis instrumental (Scharlau Chemie S.A.).

Ácido fórmico 99% calidad HPLC (Carlo Erba).

Ácido fosfórico 85% (Aldrich Chemical Company INC).

Agar Mueller-Hinton (Merck®, Alemania)

Agitador horizontal de tubos (IKA VIBRAX VXR).

Agitador magnético (Selecta Agimatic 243).

Agua ultrapura Calidad MilliQ (Millipore Simplicity®).

Agujas estériles desechables (0.8 x 25 mm 20 G, Terumo).

Alcohol etílico 96° (Storero).

Algodón hidrófilo.

Balanza analítica de precisión (Mettler AE-160).

Caldo cerebro-corazón (Merck®, Alemania)

Caldo Mueller-Hinton (Merck®, Alemania)

Centrífuga (Universal 32r, Hettich Zentrifugen).

Centrífuga (Cavour).

Columna Kromasil 100 C18 (5 μ) (Scharlau Science).

Concentrador de muestras (Techne, DB-3A).

Congelador -20°C (Fagor****).

Congelador – 80°C (Hettich)

Discos para antibiograma (Marbocyl[®], Vetoquinol, Lure, France).

Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia:

- . Bomba (Spectra Series P100, Termo Separation Products).
- . Detector ultravioleta (Spectra Series UV 100, Termo Separation Products).
- . Integrador (Datajet Integrator, Termo Separation Products).
- . Inyector automático de muestras (Spectra System AS 1000, Termo Separation Products).

Estufas de cultivo (SAN-JOR[®], Argentina)

Gradillas para almacenamiento de tubos Eppendorf.

Guantes de látex.

Helio gas (Alphagas, Air Liquide España S.A.).

Hidrógeno fosfato de diamonio (Aldrich Chemical Company INC).

Hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (Fluka).

Hoja de cálculo Microsoft[®] Excel 2007

Impresora DeskJet 720C (Hewlett Packard).

Jeringas estériles desechables 5 ml (Prexajet).

Material de vidrio diverso:

- . Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 ml.
- . Probetas de vidrio de 25, 50, 100 y 1000 ml.
- . Vasos de precipitado de 100, 500 y 1000 ml.

Mechero Bunsen

Metanol calidad HPLC (Scharlau Chemie S.A.).

Micropipetas 10, 100, 200 y 1000 μ l (Pipetman, Gilson).

Microsoft Windows XP[®]

Nefelómetro de Mc Farland

Nitrógeno gas (Alphagas, Air Liquide España S.A.).

Ordenador (AMD Athlon[®] X2).

pHmetro (MicroPH 2001, Crison).

Pipetas Pasteur.

Placas de petri de 10 cm de diámetro

Precolumna Kromasil 100 C18 (5 μ) (Scharlau Science).

Procesador de texto Microsoft Word® 2003.

Programa de tratamiento estadístico SPSS® for Windows®. Version 15 (2006)

Programa de tratamiento estadístico y gráficas. Graph Pad Prism 1.0 1994.

Programa de tratamiento farmacocinético Winnonlin® V 4.0.1 (Pharsight Corporation).

Puntas plásticas de micropipetas de 100, 200 y 1000 μ l (Daslab®).

Purificador de agua (Millipore Simplicity®).

Triclorometano para análisis instrumental (Scharlau Chemie S.A.).

Trietilamina (Scharlau Chemie S.A.).

Tubos de plástico para análisis hematológicos con y sin EDTA.

Tubos de vidrio para centrífuga de 15 ml con tapón a rosca.

Tubos Eppendorf (Nalgene).

Viales de vidrio para el inyector automático de muestras.

Viales plásticos con tapa de 5 ml de capacidad.

Inserto de fondo plano (200 μ L), FB micro-serts Nacional Scientific.

Septos de 8 mm teflon septa, 10MIL , Nacional Scientific.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES

Las vacas permanecieron en el establecimiento lechero de origen, perteneciente al INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina) situado en la Ciudad de Rafaela, Provincia de Santa Fe, Argentina.

La dieta estaba compuesta por pasturas en base a alfalfa, pienso y heno de alfalfa y tenían acceso al agua de bebida *ad libitum*.

Las terneras nacieron en un establecimiento lechero distante 5 km al sur de la ciudad de Esperanza, Provincia de Santa Fe, Argentina. Permanecieron junto a sus madres durante las primeras 12 horas de vida para asegurar la ingestión de calostro. Luego se destetaron y fueron alimentadas con leche (4 l/día), siguiendo el manejo habitual de la explotación. A partir de este momento también tuvieron pienso a su disposición, si bien la ingesta del mismo por parte de las terneras es significativa a partir de los 10 días de edad, aproximadamente.

Previo a cada estudio los animales se sometieron a examen clínico general y se les practicó una analítica sanguínea para conocer su estado de salud. A los terneros neonatos el análisis de sangre se les practicó luego de finalizada la toma de muestras.

Con una antelación de 15 días al estudio intramamario, y a los fines de verificar la inocuidad de la forma farmacéutica elaborada, se trataron tres animales con la misma dosis y formulación. En cada vaca se practicó recuento de células somáticas (RCS) y semiología antes y después del tratamiento.

Las terneras no recibieron medicación alguna entre ensayos, mientras que las vacas tampoco fueron medicadas durante los 60 días previos al inicio de cada experimento. Las vacunaciones siguieron el calendario del establecimiento propietario de los animales.

III.2.2. ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO

Pautas de utilización de los animales

Se utilizaron seis vacas para caracterizar el comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin tras la administración intravenosa, intramuscular e intramamaria. El período entre dichas administraciones fue de 30 días (>10 semividas).

Las terneras fueron utilizadas de la siguiente manera

Administración intravenosa en neonatos: Seis terneras.

Administración oral en neonatos: Seis terneras.

Administración intravenosa 10 días de vida: Seis terneras.

Administración oral 10 días de vida: Seis terneras.

Administración intravenosa 50 días de vida: Seis terneras.

Administración oral 50 días de vida: Doce terneras.

Por vía intravenosa se administró a las vacas una dosis única de 2 mg de marbofloxacin por kilogramo de peso vivo en forma de bolus (<1 minuto), de una solución comercial de marbofloxacin al 10% (Marbocyl® 10%) en la vena yugular izquierda.

Las terneras recibieron también un bolus intravenoso de Marbocyl® 10 % a razón de 2 mg/kg en la vena yugular izquierda a las 16-40 horas de vida, a los 10 días y a los 50 días de edad.

La dosis intramuscular en vacas fue de 2 mg de marbofloxacin por kilogramo de peso y se administró en la musculatura del cuello. El preparado comercial utilizado fue el mismo que para la administración intravenosa (Marbocyl® 10 %)

Por vía intramamaria se colocaron 100 mg de marbofloxacin por cuarterón en dosis única. Como no existe preparado comercial de marbofloxacin para ser administrado por esta vía, se formularon pomos conteniendo 100 mg de marbofloxacin en 10 ml de vehículo oleoso. El producto fue elaborado por la compañía farmacéutica Allignani Hnos. S.R.L. de Argentina, a partir de marbofloxacin provista por el laboratorio Vetoquinol (Lure, Francia).

El tratamiento oral de las terneras se realizó por deglución simple, a razón de 2 mg/kg de Marbocyl® bolus a las 16-40 h de vida y 10 días de edad. A los 50 días de edad, de los 12 animales experimentales, 6 recibieron una dosis de 2 mg/kg, y otras 6 terneras recibieron 5 mg/kg de marbofloxacin.

III.2.3. TOMA DE MUESTRAS

Obtención de muestras de sangre en vacas y terneras

La toma de muestras de sangre se realizó mediante punción de la vena yugular derecha con jeringas estériles desechables previamente heparinizadas. En las terneras se extrajeron 2 ml de sangre en cada extracción, mientras que en las vacas el volumen extraído fue de 4 ml.

Las extracciones de sangre en terneras recién nacidas tratadas por vía intravenosa se realizaron antes de la administración del fármaco (muestra 0) y a los 5, 10, 15, 22, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30 y 36 horas después de la administración. Luego de la dosificación oral, los muestreos se realizaron antes de la administración del fármaco (muestra 0) y a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 11, 15, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas luego de la administración.

En terneras de 10 días de vida tratadas por vía intravenosa se realizaron tomas de muestra antes de la administración del fármaco (muestra 0) y a los 5, 10, 15, 22, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30 y 36 horas después de la administración. Por su parte, luego de la administración oral se tomaron muestras antes de la administración del fármaco (muestra 0) y a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas luego.

Los animales de 50 días de vida tratados por vía intravenosa se muestrearon antes de la administración del fármaco (muestra 0) y a los 5, 10, 15, 22, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36 y 48 horas después de la administración. En la administración oral, las terneras fueron sangradas a los siguiente tiempos pre-fijados: antes de la administración del fármaco (muestra 0) y a los 5, 10, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36 y 48 horas después de la administración.

Las extracciones de sangre en vacas tratadas por vía intravenosa se realizaron antes de la administración del fármaco (muestra pre-tratamiento o muestra 0) y a los 5, 10, 15, 22, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36 y 48 horas después de la administración.

El muestreo en vacas tratadas por vía intramuscular fue a los 0, 10, 22, 30, 45, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36 y 48 horas. Por

último, a los animales medicados por vía intramamaria se les extrajeron muestras de sangre a los 0, 15, 30, 60, 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 31, y 48 horas . Estas modificaciones en la toma de muestras realizada en los últimos dos ensayos se hizo a los fines de evitar el estrés innecesario de los animales, de acuerdo al perfil plasmático esperado del fármaco (Tabla III-2).

Obtención de muestras de leche en vacas

Las muestras de leche se extrajeron de dos maneras diferentes: por ordeño manual (muestras manuales) o recogiendo una alícuota desde el lactímetro durante el ordeño de cada animal (muestras de ordeño).

Para la extracción de las muestras manualmente, se descartaron los primeros chorros de leche y luego se recogieron alícuotas de cada cuarterón para conformar la muestra final (30 ml aproximadamente).

La toma de muestras de leche se realizó en cada ensayo de la siguiente manera (Ver también Tabla III-2):

Administración intravenosa (IV):

Muestras manuales: Antes de la administración (muestra 0) y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36 y 48 h post tratamiento.

Muestras de ordeño: Antes de la administración (muestra 0) y 8, 22, 32, 48, 58 h post tratamiento. Estos horarios se utilizaron para respetar los ordeños de los animales.

Administración intramuscular (IM):

Muestras manuales: Antes de la administración (muestra 0) y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36 y 48 h post tratamiento.

Muestras de ordeño: Antes de la administración (muestra 0) y 12, 24, 36, 60 h post tratamiento

Administración intramamaria (IMam):

Muestras manuales: Antes de la administración (muestra 0), 15, 30, 60, 90 min., 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 31 y 48 h. post tratamiento.

Muestras de ordeño: Antes de la administración (muestra 0) y 7,

19, 30, 43 h post tratamiento. Estos horarios se utilizaron para respetar los ordeños de los animales.

Obtención de muestras de orina en vacas y terneras

Se tomaron muestras de orina durante la micción natural de los animales en las terneras de distintas edades y en vacas, a fin de medir el pH de la misma. La recolección se realizó en colectores de orina de plástico con tapa a rosca, determinándose inmediatamente el pH de la muestra.

Tabla III-2: Toma de muestras de sangre y leche en vacas.

Tiempo	Intravenosa			Intramuscular			Intramamaria		
	Sangre	Leche manual	Leche ordeño	Sangre	Leche manual	Leche ordeño	Sangre	Leche manual	Leche ordeño
0									
5 min									
10 min									
15 min									
22 min									
30 min									
45 min									
60 min									
90 min									
2 h									
3 h									
4 h									
6 h									
7 h									
8 h									
10 h									
12 h									
19 h									
21 h									
22 h									
24 h									
30 h									
31 h									
32 h									
33 h									
36 h									
43 h									
48 h									
56 h									
58 h									

Registro de la toma de muestras

El registro de la toma de muestras se llevó a cabo en planillas diseñadas a tal fin en las que constaban los datos de todos los animales (código de identificación, peso y edad del animal), la dosis y cantidad total de fármaco inyectado en cada caso, la vía de administración, los tiempos de extracción de las muestras y la fecha del ensayo.

III.2.4. ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Muestras de sangre: Una vez extraídas las muestras con las jeringas, la sangre se colocaba en tubos de vidrio y se centrifugaba, antes de transcurrida media hora de su extracción, a 1000 x *g* durante 10 minutos. El plasma resultante se separaba mediante pipetas Pasteur y se traspasaba a crioviales rotulados según los códigos asentados en la planilla de registro de toma de muestras. Después, las muestras se refrigeraban y almacenaban a -20 °C durante 15 días y luego a -80 °C hasta su análisis.

Muestras de leche: Se recolectaban en frascos plásticos estériles con capacidad de 100 ml, manteniéndose refrigeradas. Posteriormente se traspasaba, previa homogeneización de la muestra, un volumen de 2 ml a crioviales rotulados según los códigos asentados en la planilla de registro de toma de muestras. Después, se almacenaban a -20 °C durante 15 días y luego a -80 °C hasta su análisis.

III.2.5. TÉCNICA EXTRACTIVA

Previo a su análisis, las muestras de plasma y leche fueron descongeladas a temperatura ambiente siendo en todo momento resguardadas de la incidencia de la luz solar directa.

La metodología extractiva fue adaptada a partir de la reportada por

Waxman y col. (2001).

Plasma:

Se colocaban 300 μ l de plasma en un tubo de centrífuga de 15 ml de capacidad con tapón a rosca. Se añadían 75 μ l de una solución de patrón interno que contiene una concentración de 2,5 μ g/ml de ofloxacin disuelta en ácido fórmico 0,1 N (pH 7,02) de tal manera que la concentración final de patrón interno en la muestra antes del procesado era de 0,5 μ g/ml

La mezcla se agitaba en agitador horizontal (1000 r.p.m.) durante 2 minutos. Se agregaban 4,5 ml de cloroformo, se tapaban los tubos con el tapón a rosca y se agitaban (800 r.p.m.) durante 10 minutos más. A continuación se centrifugaban las muestras a 3200 x *g* en centrífuga refrigerada (10 °C) durante 7 minutos. Posteriormente se refrigeraban las muestras (4-8 °C) durante 10 minutos y luego toda la fase orgánica se separaba con pipetas Pasteur, se traspasaba a otro tubo de vidrio y se llevaba a sequedad en corriente de nitrógeno a 40°C por medio de un desecador de muestras. El residuo obtenido se reconstituía con 150 μ l de fase móvil y se colocaba en viales de vidrio apropiados para su inclusión en el inyector automático y su posterior lectura.

Leche:

Se siguieron dos técnicas ligeramente diferentes, en función de la concentración de marbofloxacin esperada.

La leche procedente de estudio cinético tras administración IM o IV seguía la misma técnica que el plasma: Se colocaban 300 μ l de leche en un tubo de centrífuga de 15 ml de capacidad con tapón a rosca. Se añadían 75 μ l de una solución de patrón interno que contiene una concentración de 2,5 μ g/ml de ofloxacin disuelta en ácido fórmico 0,1 N (pH 7,02) de tal manera que la concentración final de patrón interno en la muestra antes del procesado era de 0,5 μ g/ml. La mezcla se agitaba en agitador horizontal (1000 r.p.m.) durante 2 minutos. Se agregaban 4,5 ml de cloroformo, se tapaban los tubos con el tapón a rosca y se agitaban (800 r.p.m.) durante 10 minutos más. A continuación se centrifugaban las muestras a 3200 x *g* en centrífuga refrigerada (10 °C)

durante 7 minutos. Posteriormente se refrigeraban las muestras (4-8 °C) durante 10 minutos y luego toda la fase orgánica se separaba con pipetas Pasteur, se traspasaba a otro tubo de vidrio y se llevaba a sequedad en corriente de nitrógeno a 40°C por medio de un desecador de muestras. El residuo obtenido se reconstituía con 150 µl de fase móvil,

En vista de que la leche obtenida para la cinética tras administración intramamaria IMam, podía presentar concentraciones que superaran el intervalo de linealidad estudiado, se modificó la técnica anteriormente descrita de la siguiente manera: Los pasos hasta el proceso de desecado a 40°C fueron similares, pero la reconstitución en fase móvil se realizó, con volúmenes variables desde 150 µl hasta 7,5 ml. El patrón interno ofloxacina fue luego agregado hasta alcanzar la misma concentración final (0.5 µg/mL), a fin de mantener la relación ABC_{mfx}/ABC_{oflo} en las rectas de calibración.

Previamente se había comprobado la capacidad extractiva de la técnica frente a elevadas concentraciones (10, 25, 50, 75, 100 y 250 µg/ml) de fármaco en las muestras de leche. Se comprobó si había diferencias entre diluir las muestras con leche blanco previamente al procesado, o bien aplicar la técnica extractiva en las muestras sin diluir y, una vez desecadas, aplicar diferentes diluciones con fase móvil para su inyección en el cromatógrafo. Los resultados obtenidos de ABC no mostraron diferencias entre ambos procedimientos por lo que se optó por la segunda opción ya que en el primer caso se requerían grandes cantidades de leche para diluir las muestras y la homogeneización era más complicada.

III.2.6. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Detección de fármacos

La metodología para la detección de la marbofloxacin y del patrón interno se adaptó a partir de los procedimientos descritos previamente por

Waxman y col. (2001) basados en la cromatografía líquida de alta eficacia.

Las condiciones analíticas escogidas fueron las siguientes:

Se utilizó una fase móvil compuesta por solución tampón de pH 2.7: metanol: acetonitrilo: ácido acético: trietilamina (74: 20: 4: 1: 1, v/v/v/v/v). El tampón es una solución acuosa al 0.4% de hidrogenofosfato de amonio (p/v) y 0.4% de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (p/v). El pH se ajustó con ácido fosfórico al 85 %.

La columna utilizada fue una Kromasil C₁₈ (5 μ) 15 x 0,46 cm. (Scharlau Science) y como precolumna se utilizó una Kromasil C₁₈ (5 μ) (Scharlau Science).

La longitud de onda seleccionada fue de 295 nm. Para la elección de la longitud de onda se tuvo en cuenta el método propuesto por Waxman y col. (2001) y se realizó un espectro de absorción en el rango de luz ultravioleta de la sustancia disuelta en ácido fórmico 0,1 N en una concentración de 1 μ g/ml.

La fase móvil corría a un flujo isocrático de 0,6 ml/min y a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente) y el volumen de muestra inyectada era de 20 μ l.

Linealidad

Para el estudio de la linealidad se utilizaron soluciones de marbofloxacina en ácido fórmico 0.1 N. El rango de concentraciones estudiadas fue de 0.01 μ g/ml a 10 μ g/ml. Las soluciones fueron preparadas cada día por cuadruplicado y cada solución inyectada por duplicado, determinándose el área bajo la curva cromatográfica (ABCC) media y el desvío estándar para cada concentración. Los resultados fueron procesados mediante regresión lineal obteniéndose una ecuación que define la relación existente entre las distintas concentraciones ensayadas y la respuesta observada (ABC).

Precisión y exactitud

La precisión refleja la proximidad entre las diferentes medidas

individuales de una misma concentración. Se describe por el coeficiente de variación, por lo tanto:

$$\text{Precisión (\%)} = (\text{DE}/\text{media}) \times 100$$

Donde DE es la desviación estándar.

Se determinó para cada concentración dentro del mismo día (repetibilidad) y en distintos días (reproducibilidad) siguiendo el mismo método. Se considera que para cada nivel de concentración estos valores no deben ser superiores al 15 %, excepto para el límite de cuantificación que puede ser de hasta el 20 %.

La exactitud, en cambio, describe la proximidad de los resultados obtenidos a partir del método analítico respecto del valor verdadero.

$$\text{Exactitud (\%)} = (\text{Concentración experimental}/\text{Concentración teórica}) \times 100$$

El valor de este criterio debe encontrarse en un valor entre 80-120%

En ambas metodologías los coeficientes de variación tanto intra-día como inter-día se calcularon para tres concentraciones distintas (0,025, 0,5 y 5 µg/ml), que fueron analizadas por triplicado (intra-día), tres días distintos (inter-día).

Recuperación

La recuperación del método extractivo se calculó comparando las áreas bajo la curva obtenidas para nueve concentraciones distintas (0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 Y 10 µg/ml) en ácido fórmico 0,1 N *versus* plasma o leche.

Se utilizaron 6 mediciones de cada concentración realizadas en días diferentes, mediante la adición al plasma o leche de un pequeño volumen (<4 %) de distintas soluciones de marbofloxacin que permitan lograr dichas concentraciones.

Este valor se determinó sólo para establecer la bondad de nuestro método extractivo y no para el cálculo de las concentraciones de marbofloxacin, ya que las rectas de calibración utilizadas para dicho cálculo fueron confeccionadas en plasma y leche. Por tanto, no fue necesario corregir

los resultados con el valor de la recuperación.

Rectas de calibración

Se estudió la relación entre el cociente del área bajo la curva cromatográfica de distintas concentraciones de marbofloxacin sobre el área bajo la curva cromatográfica de una concentración fija de patrón interno, la ofloxacin ($ABCC_m/ABCC_o$) y la concentración de marbofloxacin. A partir de dicha relación y por medio de una regresión lineal se construyeron las rectas de calibración cuyas ecuaciones se utilizaron, posteriormente, para conocer las concentraciones de marbofloxacin presentes en las muestras problema de plasma y leche.

Se realizó, tanto en plasma como leche, una recta de calibración para las concentraciones más bajas y otra para las concentraciones más altas. Estas rectas se realizaron mediante el análisis de las siguientes concentraciones de marbofloxacin: un intervalo de 0.01 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 $\mu\text{g/ml}$) para la primera recta y de 0,5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,5; 1; 2,5; 5; 10 $\mu\text{g/ml}$) para la segunda.

Tanto a las muestras de plasma como a las de leche se les agregó la solución de patrón interno tal como se describe anteriormente en el punto sobre extracción de los fármacos.

Límite de detección

El límite de detección indica la mínima concentración del fármaco analizado que puede ser detectada con el método analítico utilizado. Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$L.D. = \frac{k.DE.}{m}$$

donde:

L.D. es el límite de detección.

k es la constante que indica el margen de seguridad y es igual a 3.

DE es la desviación estándar de las muestras blanco.

m es la pendiente de la recta de calibración.

Límite de cuantificación

Se corresponde con la concentración más baja que puede cuantificarse empleando el método validado. Es aquel identificable y reproducible con una precisión menor de 20 % y una exactitud de 80-120 %.

III.2.7. TRATAMIENTO CINÉTICO

Los valores de la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin en función del tiempo se ajustaron a modelos farmacocinéticos compartimentales y/o no compartimentales basados en la teoría de los momentos estadísticos mediante el programa de cálculo de parámetros farmacocinéticos Winnonlin®.

La determinación del número de compartimientos que mejor describa el perfil farmacocinético de ambos fármacos en suero se realizó teniendo en cuenta los residuales, la correlación entre los valores observados y los predichos por el modelo (Gabrielsson y Weiner, 1994) y según las pruebas estadísticas de criterio de Akaike (Yamaoka y col., 1978) y de Schwartz (Schwartz, 1978).

Los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidos de cada animal fueron procesados y ajustados de forma individual y posteriormente se procedió al cálculo de la media de los parámetros farmacocinéticos entre los (n) individuos que conformaban cada uno de los ensayos realizados.

El cálculo de la biodisponibilidad por vía oral e intramuscular se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$F(\%) = \left(\frac{ABC_{\infty e.v.}}{D_{e.v.}} \right) \times \left(\frac{D_{i.v.}}{ABC_{\infty i.v.}} \right) \times 100$$

donde:

$F(\%)$ es la biodisponibilidad porcentual.

$ABC_{\infty e.v.}$ es el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo desde el tiempo 0 hasta infinito para la vía

extravasacular.

$D_{e.v.}$ es la dosis administrada por la vía extravascular.

$ABC_{\infty i.v.}$ es el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo desde el tiempo 0 hasta infinito para la vía intravenosa.

$D_{i.v.}$ es la dosis administrada por la vía intravenosa.

III.2.8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se sometieron a un estudio descriptivo y se expresaron como media aritmética, corregida por una medida de dispersión (desviación estándar).

Se determinó el tipo de distribución de los valores de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

El estudio de la linealidad del método analítico y de la relación entre las distintas concentraciones de marbofloxacin y el cociente entre área bajo la curva cromatográfica de marbofloxacin y del patrón interno se basó en la estimación de la recta de regresión mediante mínimos cuadrados, comprobando la aleatoriedad, la linealidad y la homogeneidad de varianzas.

La medida de asociación para la variable cuantitativa se valoró mediante el coeficiente de correlación lineal (r^2). La bondad del ajuste se evaluó en función a la proximidad de este coeficiente a la unidad.

Para comparar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas se aplicó el test paramétrico de Análisis de Varianza (ANOVA) con post test (Bonferroni).

El nivel de significación fue de $p < 0,05$.

El estudio estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS 15.

III.2.9. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION INHIBITORIA MÍNIMA Y CÁLCULO DE PARÁMETROS PK/PD.

III.2.9.a Aislamiento e identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Las cepas de *S. aureus* fueron aisladas a partir de muestras de secreción de mastitis clínicas y subclínicas de vacas provenientes de establecimientos lecheros de la cuenca lechera central de la República Argentina. Se tomaron desde una hasta tres cepas por rodeo lechero hasta contar con un número de 163 cepas.

Las muestras de secreción mamaria fueron obtenidas en forma aséptica de acuerdo con metodología estándar (Hogan y col., 1999), y remitidas al Laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Rafaela. A partir de cada muestra fueron sembrados 0,01 ml en agar base Columbia suplementado con 5% de sangre ovina desfibrinada, incubándose por 24-48 hs a 35 °C en aerobiosis. Los aislamientos fueron diferenciados del género *Streptococcus* sobre la base de morfología colonial, tipo de hemólisis y prueba de la catalasa, y del género *Micrococcus* sobre la base de la prueba de oxidación/fermentación de la glucosa (Carter y col., 1995). Las cepas caracterizadas como pertenecientes al género *Staphylococcus*, fueron identificadas como *Staphylococcus aureus* mediante pruebas convencionales descriptos por el National Mastitis Council (Hogan y col., 1999)

Luego de su identificación, los aislamientos fueron mantenidos a -80°C en Infusión cerebro corazón adicionado con glicerol al 20%.

III.2.9.b Prueba de concentración mínima inhibitoria (CIM) por dilución en agar.

Esta prueba se realizó utilizando metodología estandar según los criterios recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Preparación de placas e inóculo

Para esta prueba el antimicrobiano se incorporó dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenía una concentración diferente de antibiótico. El inóculo de las distintas cepas del microorganismo se aplicó rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando un replicador, que transfiere 25 inóculos a la vez por placa.

Se utilizó marbofloxacina (Laboratorio Vetoquinol, Francia, lote 53596) con una potencia de ensayo 99,6 %. La solución madre o stock se preparó teniendo en cuenta el dato de potencia aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración (g/ml)}}{\text{Potencia de ensayo (g/mg)}}$$

Se preparó una solución stock de 5120 µg/ml (25,7 mg en 5 ml), utilizando como solvente hidróxido de sodio 1 M, y como diluyente agua destilada. Pequeños volúmenes de la solución madre (1,5 ml) se envasaron en tubos tapa a rosca estériles y se almacenaron a -80° C al abrigo de la luz hasta su uso, siendo descartados los restos de volúmenes sobrantes.

Se prepararon diluciones al doble del antibiótico (0,06 a 32 µg/ml) de acuerdo a referencias de otros autores (Meunier y col. 2004).

Como medio de prueba se utilizó agar Mueller-Hinton. Luego de esterilizar en autoclave a 120°C por 15 minutos, se dejó enfriar en baño María a 48-50°C antes de agregar en forma aséptica la solución de marbofloxacina y finalmente se vertió el medio adicionado con antibiótico en las placas correspondientes a razón de 9 partes del agar fundido, con 1 parte de cada dilución de antibiótico. El pH del medio se determinó para cada partida permitiendo que una pequeña cantidad de agar solidificara alrededor del bulbo del electrodo del peachímetro.

Las placas se prepararon de modo que se pudiera alcanzar una profundidad de agar de 4 mm y se almacenaron entre 4-8°C por un período de hasta 5 días. Antes de realizar las inoculaciones, las placas fueron atemperadas a temperatura ambiente o hasta la desaparición de humedad de su superficie en

estufa a 35°C.

Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 29213 cada vez que se realizó el test, para determinar el potencial deterioro de los antimicrobianos. Se prepararon además, placas sin antimicrobianos como control.

El inóculo se preparó tocando la parte superior de 2 a 3 colonias del mismo tipo en agar sangre ovina al 5% y transfiriéndolas a un tubo que contenía 5 ml de caldo tripteína soya. Esta solución se incubó a 35°C hasta presentar turbidez, y se ajustó al patrón de turbidez 0,5 de Mc Farland. Los cultivos ajustados a este estándar fueron diluidos 1:10 en caldo tripteína soya para obtener la concentración deseada de inóculo de 10^7 UFC/ml.

Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de resultados.

Se utilizó un multi inoculador, el cual depositó aproximadamente 1 μ l de cada aislamiento a examinar sobre la superficie del agar. El inóculo final en el agar fue de aproximadamente 10^4 UFC en un área de diámetro de 5 mm. A partir de los tubos de cada cepa con la suspensión bacteriana ajustada (10^7 UFC/ml) se colocó una alícuota de cada suspensión dentro de cada pocillo correspondiente en el bloque sembrador del multi inoculador.

Se inoculó primero una placa control (sin antibióticos) y luego se repitió la operación con las placas conteniendo las diferentes concentraciones de antimicrobiano, comenzando por la menor concentración. Al finalizar, se inoculó una segunda placa control para asegurarse la ausencia de contaminación o de traspaso de antimicrobianos durante el proceso.

Las placas inoculadas se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que la humedad de los puntos del inóculo fuera absorbida por el agar. Luego se invirtieron las mismas y se incubaron a 35°C por 16 a 20 h. Para determinar los puntos finales, las placas se observaron sobre una superficie oscura. Se registró la CIM como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento. No se consideraron colonias individuales o la zona borrosa causada por el inóculo. Las CIM₅₀ y CIM₉₀ se consideraron como las menores concentraciones de antimicrobiano necesarias para impedir o inhibir el crecimiento bacteriano del 50 y 90 % de las cepas estudiadas,

respectivamente.

El criterio de interpretación de los puntos de corte se basó en la información técnica aportada por el laboratorio Vetoquinol®, cotejando cada cepa con los discos de antibiograma (5 µg de marbofloxacin) (Tabla III-3).

Tabla III-3: Criterio de interpretación de puntos de corte para la determinación de susceptibilidad.

Interpretación	Diámetro de la zona de inhibición (mm)	CIM (µg/ml)
Sensible	≥ 18	≤ 1
Moderadamente sensible	$>14 <18$	2,0
Resistente	≤ 14	$>2,0$

Determinación de parámetros PK/PD

Basándose en los resultados obtenidos previamente en cuanto a la disposición de marbofloxacin en leche bovina, y a los datos aportados por la determinación de CIM frente a las cepas de *S. aureus* aisladas, se determinaron los siguientes parámetros indicadores de eficacia antimicrobiana:

$$C_{\max} / \text{CIM}_{90}$$

$$\text{ABC}_{0-\text{last}} / \text{CIM}_{90}$$

IV – RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. EXAMEN CLÍNICO Y ANALÍTICA SANGUÍNEA DE LOS ANIMALES

El examen clínico, así como los análisis hematológicos realizados, pusieron de manifiesto el correcto estado de salud de los animales.

Durante el tiempo que duró el estudio no se observó ningún signo de alteración de dicho estado. Tampoco se observó inflamación o manifestaciones de dolor tras la administración de los fármacos a estudiar por las diferentes vías.

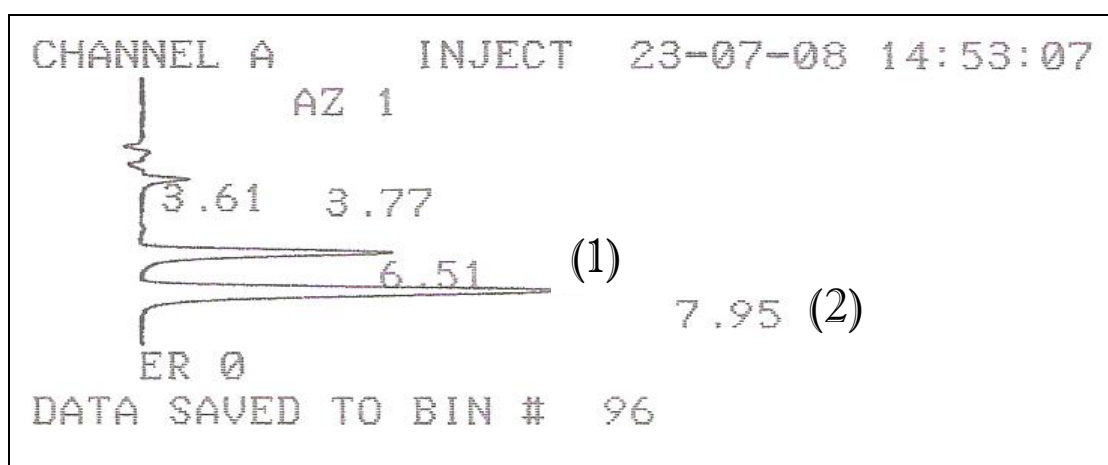
No han sido observadas en ninguno de los animales que conformaron el lote piloto de 3 vacas con el cual se ensayó la inocuidad del preparado para uso intramamario, alteraciones locales o sistémicas de ningún tipo, considerándose por tanto inocuo el producto formulado.

IV.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Condiciones cromatográficas

Con el método cromatográfico utilizado se obtuvo una buena separación de marbofloxacin y del patrón interno ofloxacin, del resto de picos cromatográficos, presentando estos un tiempo de retención promedio de $6,50 \pm 0,30$ min y de $7,95 \pm 0,30$ min, respectivamente (figura IV.2.)

Figura IV.2. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra plasmática con marbofloxacin (1) y ofloxacin (2), como P.I.



Linealidad

La relación existente entre las distintas concentraciones de marbofloxacin (CC) disuelta en ácido fórmico 0,1 N y el área bajo la curva cromatográfica (ABC) resultó lineal en el rango de concentraciones ensayadas (0,01-10 µg/ml) y la ecuación de la recta obtenida mediante regresión lineal por mínimos cuadrados es la siguiente:

$$ABC = 41629 \times CC + 69143$$

$$(r^2 = 0,990)$$

(figura IV.3.)

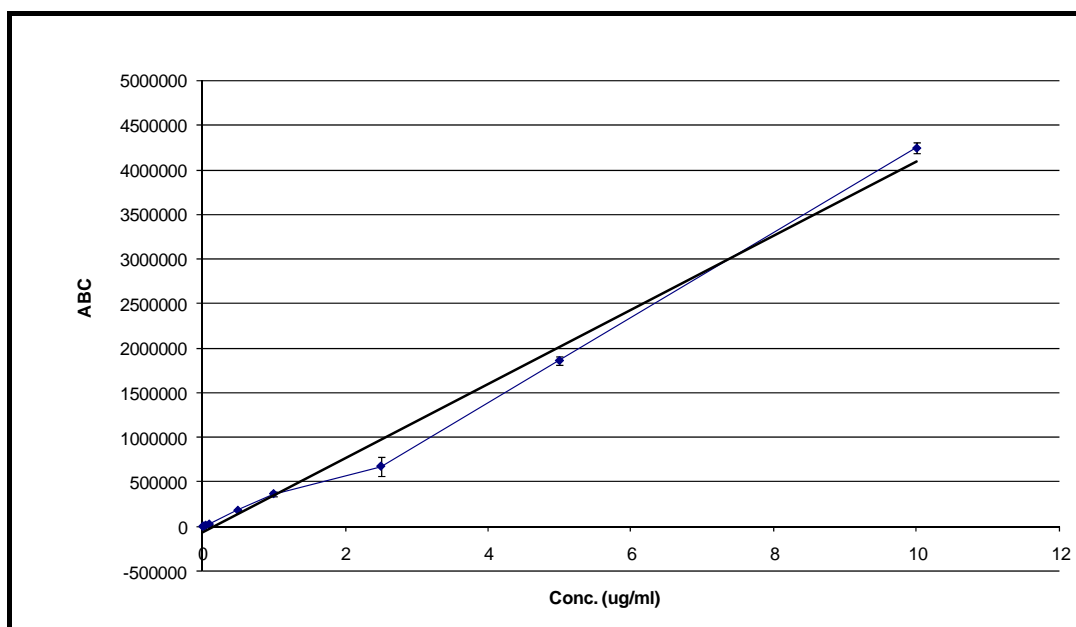


Figura IV.3. Representación de la recta obtenida mediante regresión lineal de la relación entre las concentraciones de marbofloxacin en ácido fórmico 0,1 N y el área bajo la curva cromatográfica.

Reproducibilidad del método analítico

La variabilidad interdía e intradía del método analítico en plasma y leche bovina han resultado en los siguientes coeficientes de variación (media ± D.E.).

$$C.V. \text{ interdía}_{\text{plasma}} = 4,397 \pm 3,576 \%$$

$$C.V. \text{ intradía}_{\text{plasma}} = 4,040 \pm 1,315 \%$$

$$\text{C.V. interdía}_{\text{leche}} = 2,941 \pm 2,524 \%$$

$$\text{C.V. intradía}_{\text{leche}} = 1,393 \pm 0,632 \%$$

Recuperación de la metodología extractiva

Se determinaron los siguientes porcentajes de recuperación para las distintas matrices utilizadas:

PLASMA: $106,9 \pm 26,8 \%$

LECHE: $88,3 \pm 23,5 \%$

Rectas de calibración

En la tabla IV-1 se muestran los valores de concentración de marbofloxacin (µg/ml) y la relación entre las áreas bajo la curva de la marbofloxacin (ABCM) y de ofloxacin (ABCO) con los que se construyeron las rectas de calibrado en plasma bovino.

Tabla IV-1.- Relación ABCM/ABCO correspondiente a las distintas concentraciones de marbofloxacin en plasma.

CONCENTRACIÓN (µg/ml)	ABCM/ABCO (media ± DE)
0,01	0.0288 ± 0.0225
0,025	0.0706 ± 0.0132
0,05	0.1211 ± 0.0132
0,1	0.2501 ± 0.0197
0,5	1.2079 ± 0.0641
1	2.4009 ± 0.1066
2,5	5.8303 ± 0.1292
5	12.2432 ± 0.8738
10	23.7079 ± 0.5139

El análisis, mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, de los valores del cociente entre el área bajo la curva cromatográfica de marbofloxacin y el área bajo la curva cromatográfica del patrón interno (ABCM/ABCO), para las

concentraciones de marbofloxacin **en plasma** comprendidas entre 0,01 y 1 µg/ml (concentraciones bajas), dio lugar a la siguiente ecuación:

$$\text{ABCM/ABCo} = 2,394 \cdot \text{CC} + 0,008$$
$$(r^2 = 0,999)$$

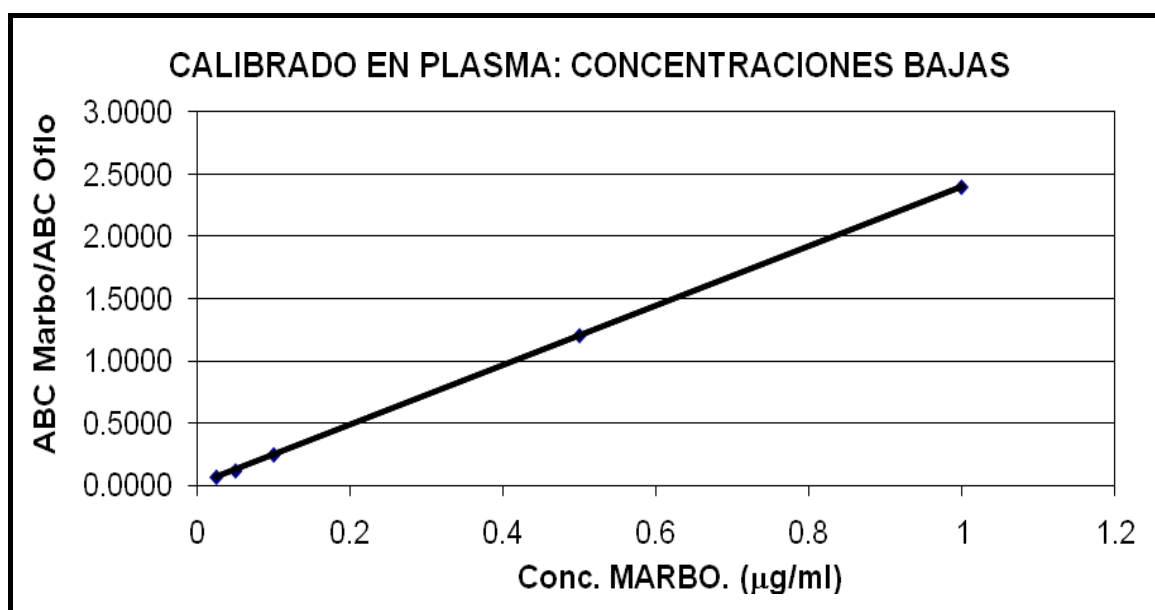


Figura IV-4.- Recta de calibración para las concentraciones de marbofloxacin en plasma comprendidas entre 0,001 y 1 µg/ml.

El mismo análisis para concentraciones de marbofloxacin comprendidas entre 1 y 10 µg/ml (concentraciones altas):

$$\text{ABCM/ABCo} = 2,376 \cdot \text{CC} + 0,056$$
$$(r^2 = 0,999)$$

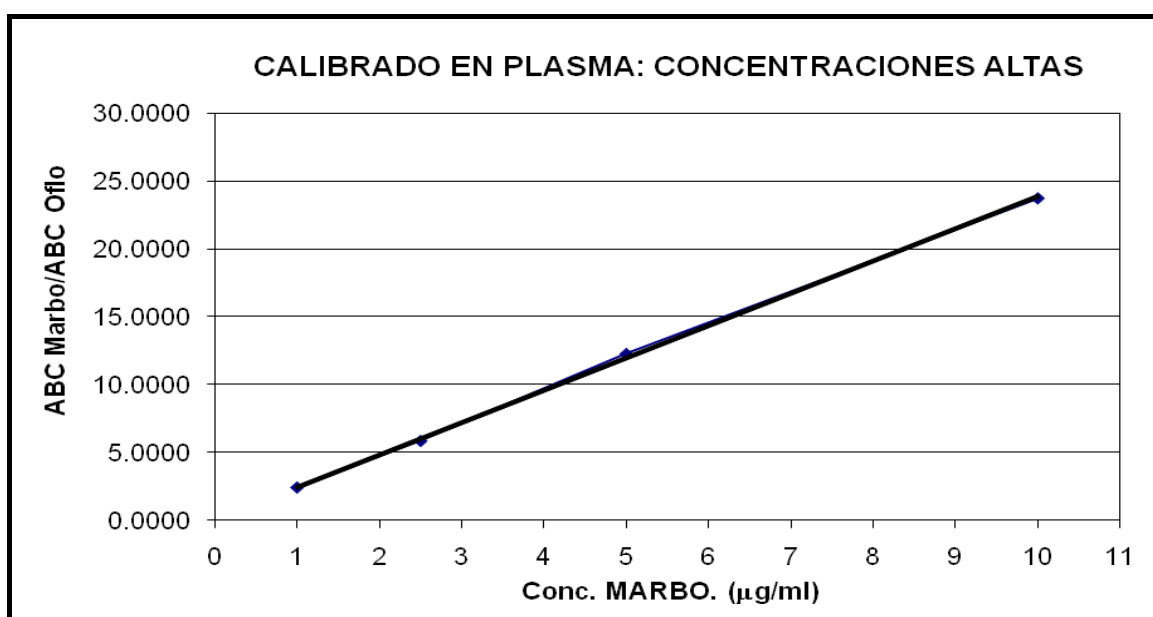


Figura IV-5.- Recta de calibración para las concentraciones de marbofloxacina en plasma comprendidas entre 1 y 10 µg/ml.

Por su parte, el análisis realizado **en leche** para las concentraciones de marbofloxacina comprendidas entre 0,01 y 1 µg/ml, dio lugar a la siguiente ecuación:

$$\text{AUCm} = 2,420 \times \text{CC} + 0,004$$

$$(r^2 = 0,99)$$

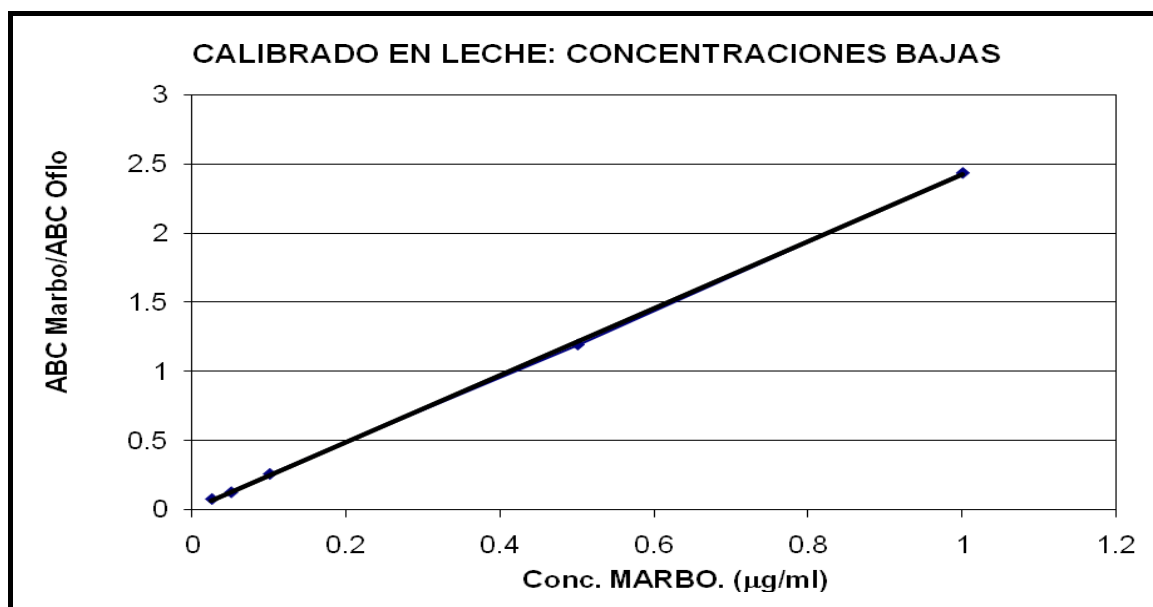


Figura IV-6.- Recta de calibración para las concentraciones de marbofloxacina en leche comprendidas entre 0,001 y 1 µg/ml.

El mismo análisis para concentraciones de marbofloxacin comprendidas entre 1 y 10 µg/ml:

$$\text{AUCm} = 2,288 \times \text{CC} + 0,006$$
$$(r^2 = 0,99)$$

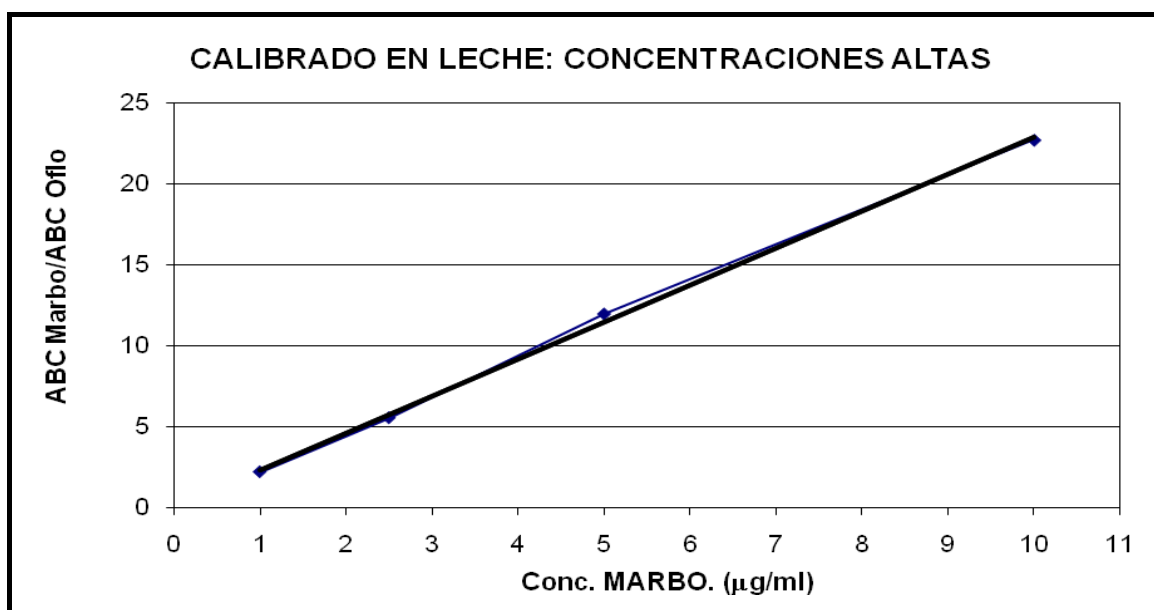


Figura IV-7.- Recta de calibración para las concentraciones de marbofloxacin en leche comprendidas entre 1 y 10 µg/ml.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación del método analítico calculado para la marbofloxacin en plasma fue de 0,025 µg/ml con un valor de exactitud de $112 \pm 4,11\%$ y de precisión de $8,61 \pm 4,21\%$.

En leche, por su parte, se determinó similar valor de límite de cuantificación (0,025 µg/ml) con una exactitud de $116 \pm 3,22 \%$ y una precisión de $7,32 \pm 5,03 \%$

IV.3. TRATAMIENTO CINÉTICO

IV.3.1. Administración intravenosa en terneras neonatas.

En la tabla IV.2 se reflejan las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin (n=5). En la figura IV.8 se muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes. El animal N° 6 debió ser descartado del ensayo debido a que parte de la dosis administrada se extravasó.

El pH de orina en estos animales fue de $6,04 \pm 0,24$.

Tabla IV.2- Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacin tras la administración intravenosa en terneras neonatas.

Tiempo (h)	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 3	TERNERA 4	TERNERA 5	MEDIA	DESV. EST.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.083	1.299	2.322	3.323	2.427	2.794	2.299	0.743
0.166	1.260	1.878	2.945	2.147	2.143	1.976	0.593
0.25	1.250	1.982	2.713	1.981	1.834	1.895	0.487
0.366	1.106	1.337	2.170	1.962	1.816	1.881	0.636
0.5	0.769	1.515	2.529	1.877	1.738	1.664	0.572
0.75	0.711	1.578	2.447	1.800	1.562	1.588	0.562
1	0.735	1.550	2.502	1.696	1.487	1.554	0.572
1.5	0.709	1.398	2.305	1.629	1.155	1.551	0.554
2	0.640	1.249	2.237	1.668	1.262	1.382	0.532
3	0.467	1.289	2.183	1.413	1.142	1.462	0.500
4	0.347	1.332	1.647	1.097	0.915	1.045	0.439
6	0.317	1.308	1.909	1.367	0.754	1.165	0.554
8	0.266	1.025	1.726	0.937	0.787	0.895	0.487
10	0.217	1.116	1.719	0.985	0.724	0.863	0.538
12	0.156	1.017	1.446	0.905	0.548	0.747	0.467
24	0.030	0.725	1.088	0.502	0.149	0.426	0.424
30	MLC	0.519	1.013	0.245	0.151	0.333	0.378
36	MLC	0.281	0.484	0.204	0.088	0.182	0.181

MLC: Menor al límite de cuantificación.

En las tablas IV.3 y I.V.4 se muestran los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelos bicompartimental y no compartimental.

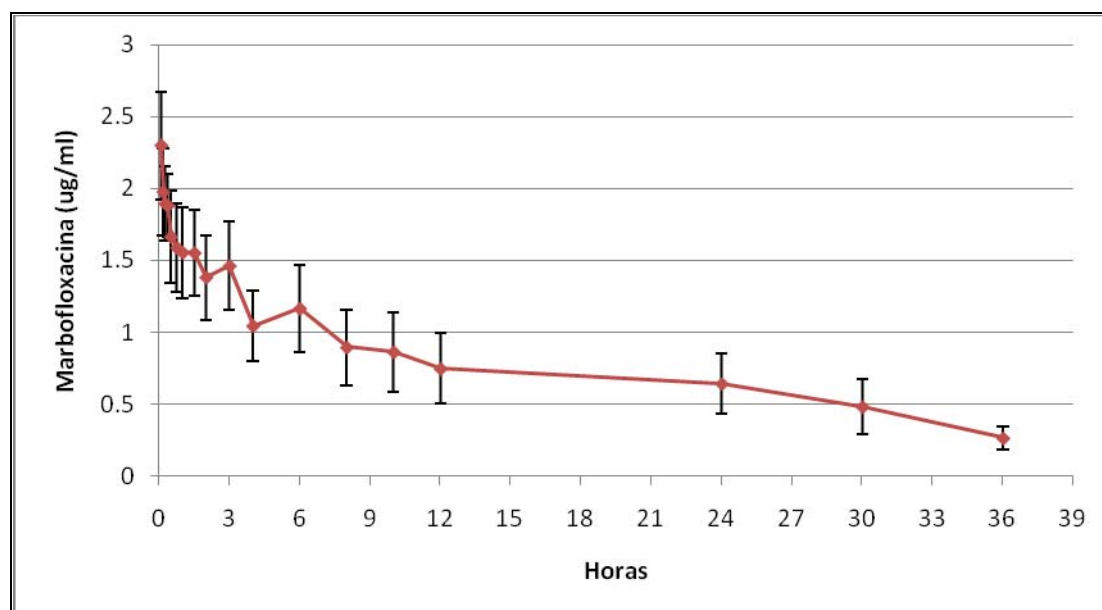


Figura IV.8- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin (Media \pm D.E.; n=5) tras la administración de una dosis intravenosa de 2 mg/kg en terneras neonatas.

Tabla IV.3.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en terneras neonatas (modelo bicompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 3	TERNERA 4	TERNERA 5	MEDIA	DESV. EST.
A	ug/ml	0.890	1.516	0.753	1.584	0.252	0.999	0.557
B	ug/ml	1.594	2.490	1.720	1.508	1.485	1.759	0.419
α	1/h	4.028	6.891	2.695	4.606	1.702	3.984	1.982
β	1/h	0.042	0.039	0.060	0.083	0.115	0.068	0.032
ABC	ug.h/ml	41.983	65.733	28.737	16.525	13.251	33.246	21.398
$t_{1/2} K_{10}$	h	10.976	11.667	7.895	3.054	5.389	7.796	3.653
$t_{1/2} \alpha$	h	0.145	0.110	0.239	0.093	0.461	0.210	0.152
$t_{1/2} \beta$	h	19.012	18.442	11.471	6.930	6.205	12.412	6.111
K ₁₀	1/h	0.063	0.059	0.088	0.227	0.129	0.113	0.069
K ₁₂	1/h	1.997	2.284	0.876	4.052	0.181	1.878	1.483
K ₂₁	1/h	2.764	3.970	1.995	3.293	1.305	2.666	1.050
Co	ug/ml	2.651	3.905	2.523	3.750	1.704	2.907	0.918
Cl _B	ml/h.Kg	48.00	30.00	70.00	121.00	151.00	84.00	51.00
AUMC	ug.h ² /ml	1145.149	1742.878	471.091	162.412	117.288	727.764	700.509
MRT	h	27.276	26.514	16.393	9.828	8.851	17.773	8.823
Vd _{ss} (area)	l/kg	1.299	0.807	1.141	1.189	1.336	1.154	0.210

Tabla IV.4.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en terneras neonatas (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 3	TERNERA 4	TERNERA 5	MEDIA	DESV. EST.
C ₀	ug/ml	2.871	3.750	2.744	3.643	1.638	2.929	0.850
ABC _{last}	ug.h/ml	31.578	49.615	26.321	17.280	13.391	27.637	14.235
T $\frac{1}{2}$ λ	h	16.132	17.698	12.170	9.035	6.100	12.227	4.820
λ	1/h	0.043	0.039	0.057	0.077	0.114	0.066	0.030
ABC _∞	ug.h/ml	39.795	65.304	29.957	18.365	13.605	33.405	20.546
V _z	l/kg	1.169	0.782	1.172	1.420	1.294	1.167	0.238
Cl	ml/h.kg	50.258	31.000	67.000	109.000	147.000	80.852	46.853
MRT _{last}	h	13.813	14.145	11.893	9.493	7.569	11.382	2.825
MRT _∞	h	23.199	25.529	16.950	11.831	8.156	17.133	7.349
V _{ss}	l/kg	1.165	0.782	1.132	1.288	1.199	1.113	0.194

IV.3.2. Administración oral en terneras neonatas.

En la tabla IV.5 se muestran las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, tras la administración oral de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin (n=6). La figura IV.9 muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes.

El pH de orina en estos animales fue de $6,16 \pm 0,54$.

Tabla IV.2- Concentración plasmática (µg/ml) de marbofloxacin tras la administración oral en terneras neonatas.

Tiempo (h)	TERNERA 7	TERNERA 8	TERNERA 9	TERNERA 10	TERNERA 11	TERNERA 12	MEDIA	DESV. EST.
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	-	0.059	0.092	0.248	0.095	0.038	0.089	0.086
1	0.140	0.146	0.213	0.425	0.222	0.118	0.211	0.113
2	0.449	0.317	0.289	0.597	0.595	0.319	0.428	0.142
4	0.549	0.525	0.370	0.902	0.626	0.58	0.592	0.175
6	0.671	0.518	0.510	1.090	0.822	0.910	0.753	0.230
8	0.493	0.627	0.331	1.070	0.625	0.635	0.630	0.246
11	0.411	0.627	0.483	0.728	0.566	0.704	0.587	0.124
15	0.252	0.528	0.396	0.655	0.450	0.464	0.457	0.134
24	0.252	0.326	0.305	0.411	0.243	0.378	0.319	0.067
30	0.102	0.340	0.230	0.353	0.164	0.25	0.240	0.098
36	0.056	0.216	0.165	0.245	0.145	0.230	0.176	0.070
48	MLC	0.124	0.068	0.126	0.068	0.076	0.080	0.041
60	MLC	0.073	0.034	0.035	0.027	0.036	0.034	0.023
72	MLC	0.035	0.031	0.028	MLC	MLC	MLC	MLC

MLC: Menor al límite de cuantificación

Los datos de concentración plasmática se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental (tabla IV.6). Se muestran también en la tabla I.V.7 los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelo no compartimental.

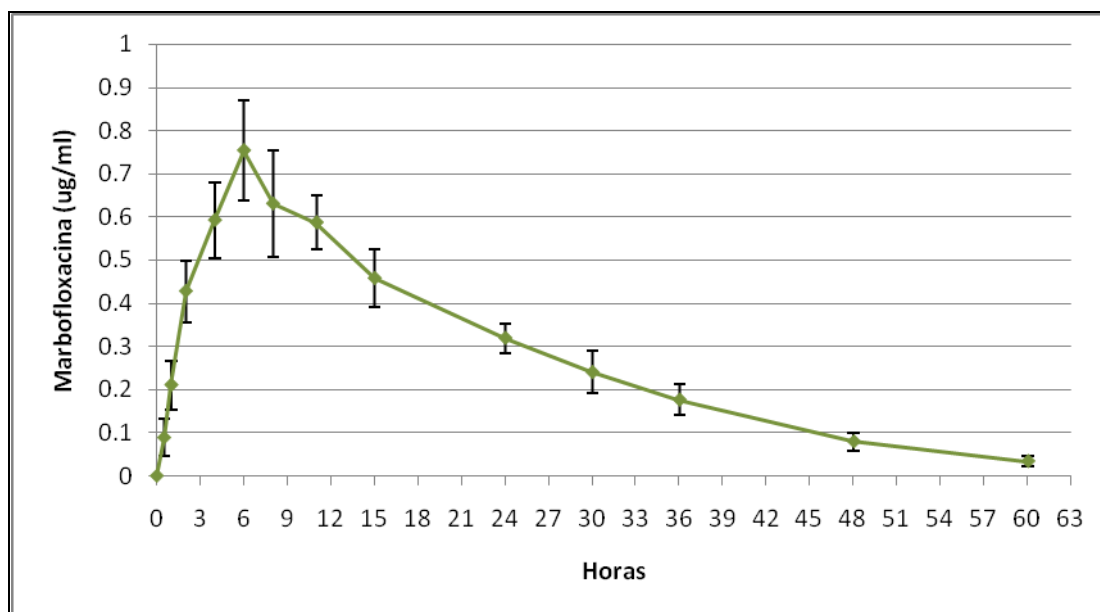


Figura IV.9- Evolución de las concentraciones plasmáticas De marbofloxacina (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis oral de 2 mg/kg en terneras neonatas.

Tabla IV.6.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral de marbofloxacina en terneras neonatas (modelo monocompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 7	TERNERA 8	TERNERA 9	TERNERA 10	TERNERA 11	TERNERA 12	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	2.139	2.036	2.649	1.370	1.851	1.582	1.938	0.450
Cmax	ug/ml	0.501	0.184	0.213	0.336	0.515	0.321	0.345	0.139
ABC	(ug.h/ml)	0.106	0.048	0.049	0.058	0.065	0.060	0.064	0.021
K01	1/h	0.652	0.091	0.329	0.005	0.392	0.798	0.378	0.308
t _{1/2} K01	h	8.817	20.331	15.36	24.846	16.474	21.018	17.808	5.564
K10	1/h	1.382	3.748	3.24	2.058	1.345	2.159	2.322	0.981
t _{1/2} K10	h	6.537	14.358	14.11	11.798	10.572	11.529	11.484	2.848
CL/F	(ml/h.kg)	226.00	98.00	130.00	80.00	121.00	95.00	125.00	52.71
V/F	(Vd area, l/kg / F)	4.581	9.918	8.598	0.275	4.976	7.219	5.928	3.447

Tabla IV.7.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral de marbofloxacin en terneras neonatas (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 7	TERNERA 8	TERNERA 9	TERNERA 10	TERNERA 11	TERNERA 12	MEDIA	DESV. EST.
T _{max}	h	6.0	10.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.7	1.6
C _{max}	ug/ml	0.671	0.627	0.510	1.090	0.822	0.910	0.772	0.211
ABC _{last}	ug.h/ml	8.676	19.395	14.637	25.331	16.530	20.215	17.464	5.644
T $\frac{1}{2}$ λ	h	7.873	14.241	14.589	12.850	11.271	11.524	12.058	2.458
λ	1/h	0.088	0.049	0.048	0.054	0.062	0.060	0.060	0.015
ABC _∞	ug.h/ml	9.149	20.115	15.241	25.931	17.007	20.887	18.055	5.703
V _z /F	l/kg	2.483	2.043	2.762	1.430	1.912	1.592	2.037	0.511
Cl/F	ml/h.kg	219.00	99.00	131.00	77.00	118.00	96.00	123.30	50.40
MRT _{last}	h	11.194	23.072	21.546	19.592	16.159	18.303	18.311	4.244
MRT _∞	h	13.064	25.631	24.376	21.234	17.844	20.178	20.388	4.566

La biodisponibilidad porcentual (F%) promedio determinada para esta edad y vía de administración fue de 54,0 %.

IV.3.3. Administración intravenosa en terneras de 10 días de vida.

En la tabla IV.8 se reflejan las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en terneras de 10 días de vida (n=6). En la figura IV.10 se muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes.

El pH de orina en estos animales fue de $5,87 \pm 0,21$.

Tabla IV.8- Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacina tras la administración intravenosa en terneras de 10 días.

Tiempo (h)	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 3	TERNERA 4	TERNERA 13	TERNERA 14	MEDIA	DESV EST.
0.083	4.997	3.360	3.574	3.645	2.518	2.267	3.393	0.970
0.166	3.950	2.859	2.611	2.474	1.762	1.874	2.588	0.792
0.25	3.296	2.521	2.519	2.376	1.751	1.789	2.375	0.570
0.333	2.772	2.431	2.321	2.223	1.703	1.664	2.186	0.431
0.5	2.416	2.339	2.300	2.201	1.443	1.552	2.042	0.428
0.75	1.886	1.728	2.290	2.197	1.375	1.579	1.842	0.355
1	1.647	1.799	2.029	1.809	1.247	1.346	1.646	0.299
1.5	1.545	1.435	1.734	1.709	1.200	1.335	1.493	0.210
2	1.456	1.116	1.702	1.607	1.134	1.171	1.364	0.258
3	1.303	1.084	1.479	1.522	1.005	1.095	1.248	0.219
4	1.210	1.004	1.221	1.254	0.902	1.025	1.103	0.144
6	1.102	0.824	1.026	1.117	0.807	0.870	0.958	0.141
8	1.004	0.814	0.881	1.058	0.712	0.663	0.855	0.157
10	0.982	0.544	0.724	0.701	0.607	0.650	0.701	0.152
12	0.807	0.467	0.575	0.093	0.501	0.548	0.499	0.232
24	0.362	0.115	0.141	0.127	0.223	0.239	0.201	0.094
30	0.214	0.064	0.111	0.093	0.179	0.149	0.135	0.056
36	0.163	0.041	0.068	0.127	0.117	0.115	0.105	0.044

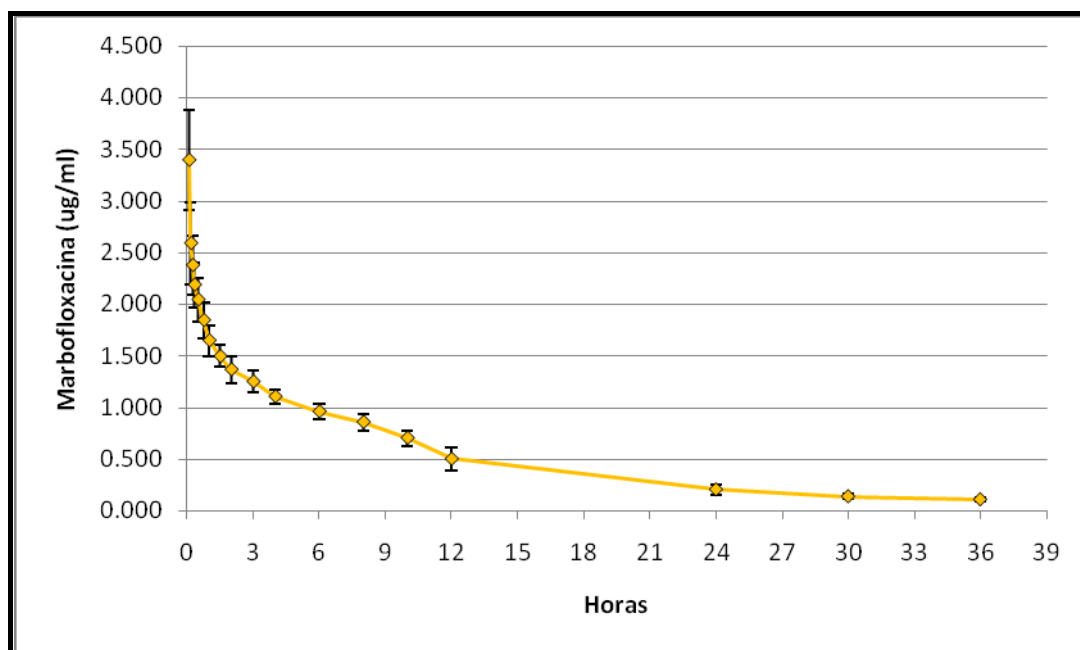


Figura IV.10- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina (Media \pm D.E.; $n=6$) tras la administración de una dosis intravenosa de 2 mg/kg en terneras de 10 días.

En las tablas IV.8 y I.V.9 se muestran los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelos bicompartimental y no compartimental.

Tabla IV.8.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en terneras de 10 días (modelo bicompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 3	TERNERA 4	TERNERA 13	TERNERA 13	MEDIA	DESV. EST.
A	ug/ml	4.309	1.979	3.662	4.746	2.203	1.079	2.996	1.454
B	ug/ml	1.679	1.546	2.345	2.114	1.388	1.489	1.760	0.383
α	1/h	3.699	2.045	13.119	13.609	8.413	4.653	7.590	4.940
β	1/h	0.065	0.103	0.131	0.104	0.085	0.089	0.096	0.022
ABC	ug.h/ml	26.895	15.967	18.185	20.645	16.519	17.037	19.208	4.115
$t_{1/2} K_{10}$	h	3.113	3.140	2.098	2.086	3.188	4.599	3.038	0.924
$t_{1/2} \alpha$	h	0.187	0.339	0.053	0.051	0.082	0.149	0.144	0.110
$t_{1/2} \beta$	h	10.622	6.725	5.293	6.655	8.118	7.824	7.539	1.812
K10	1/h	0.223	0.221	0.330	0.332	0.217	0.151	0.246	0.072
K12	1/h	2.458	0.972	7.719	9.115	4.977	1.856	4.516	3.332
K21	1/h	1.084	0.955	5.201	4.266	3.304	2.735	2.924	1.699
Co	ug/ml	5.988	3.524	6.007	6.860	3.592	2.568	4.756	1.742
Cl _B	ml/h.Kg	74.36	125.26	109.98	96.87	121.07	117.39	107.50	19.05
AUMC	ug.h ² /ml	394.611	146.003	136.744	194.884	190.426	189.747	208.7	94.4
MRT	h	14.672	9.144	7.520	9.440	11.528	11.137	10.6	2.477
Vd _{ss} (area)	l/kg	1.091	1.145	0.827	0.914	1.395	1.307	1.113	0.219

Tabla IV.9.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en terneras de 10 días (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 3	TERNERA 4	TERNERA 13	TERNERA 14	MEDIA	DESV. EST.
C ₀	ug/ml	6.322	3.949	4.892	5.370	3.598	2.742	4.479	1.299
ABC _{last}	ug.h/ml	25.066	15.971	19.853	24.571	16.847	17.612	19.987	3.961
$T_{1/2} \lambda$	h	10.601	6.786	7.122	7.730	11.746	9.806	8.965	2.039
λ	1/h	0.065	0.102	0.097	0.090	0.059	0.071	0.081	0.018
ABC _∞	ug.h/ml	27.497	16.3344	20.4343	25.4898	18.8089	19.0581	21.270	4.303
V _z	l/kg	1.112	1.198	1.005	0.875	1.801	1.484	1.246	0.341
Cl	ml/h.kg	72.73	122.44	97.87	78.46	106.33	104.94	97.13	18.60
MRT _{last}	h	10.5561	7.8352	8.0842	7.4064	10.504	10.2049	9.098	1.471
MRT _∞	h	14.1582	8.6787	9.1717	8.8398	14.9308	13.2359	11.503	2.909
V _{ss}	l/kg	1.029	1.062	0.897	0.693	1.587	1.389	1.110	0.326

IV.3.4. Administración oral en terneras de 10 días de vida.

En la tabla IV.10 se muestran las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, tras la administración oral de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en terneras de 10 días de vida (n=6). La figura IV.11 muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes.

El pH de orina en estos animales fue de $6,14 \pm 0,68$.

Tabla IV.10- Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacin tras la administración oral en terneras de 10 días.

Tiempo (h)	TERNERA 7	TERNERA 8	TERNERA 9	TERNERA 10	TERNERA 11	TERNERA 12	MEDIA	DESV. EST.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.5	0.052	0.115	0.153	0.036	0.032	0.075	0.077	0.048
1	0.241	0.102	0.414	0.076	0.104	0.047	0.164	0.139
2	0.379	0.134	0.529	0.137	0.235	0.080	0.249	0.173
4	0.771	0.194	0.614	0.172	0.328	0.096	0.362	0.271
6	0.501	0.245	0.579	0.276	0.444	0.160	0.367	0.164
8	0.389	0.287	0.395	0.273	0.391	0.178	0.319	0.088
12	0.333	0.238	0.268	0.292	0.320	0.173	0.271	0.059
24	0.201	0.249	0.184	0.238	0.199	0.146	0.203	0.037
30	0.160	0.194	0.145	0.146	0.141	0.120	0.151	0.025
36	0.117	0.089	0.093	0.107	0.104	0.103	0.102	0.010
48	0.077	0.066	0.055	0.067	0.060	0.071	0.066	0.008
60	0.043	0.035	0.026	0.025	0.033	0.041	0.034	0.007
72	0.034	0.029	0.026	MLC	0.030	0.034	0.029	0.005

MLC: Menor al límite de cuantificación

Los datos de concentración plasmática se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental (tabla IV.11). Se muestran también en la tabla I.V.12 los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelo no compartimental.

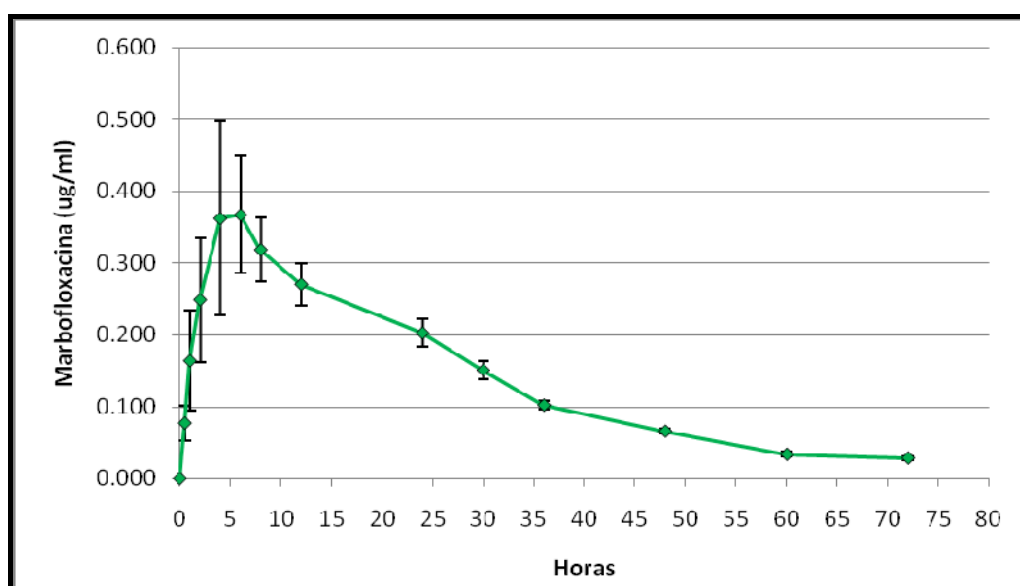


Figura IV.11- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis oral de 2 mg/kg en terneras de 10 días.

Tabla IV.11.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral de marbofloxacin en terneras de 10 días (modelo monocompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 7	TERNERA 8	TERNERA 9	TERNERA 10	TERNERA 11	TERNERA 12	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	4.023	12.135	3.677	11.430	6.657	11.676	9.115	3.763
Cmax	ug/ml	0.568	0.274	0.634	0.299	0.397	0.178	0.356	0.174
ABC	(ug.h/ml)	11.753	10.148	15.571	9.514	10.749	8.243	10.845	2.801
K01	1/h	0.772	0.072	0.888	0.108	0.364	0.191	0.324	0.334
t _{1/2} K01	h	0.898	9.595	0.781	6.397	1.906	3.635	4.463	3.566
K10	1/h	0.060	0.074	0.048	0.069	0.051	0.031	0.055	0.018
t _{1/2} K10	h	11.563	9.312	14.399	9.974	13.615	22.638	13.988	5.318
CL/F	(ml/h.kg)	170.17	197.00	128.00	210.00	186.00	242.64	192.72	41.96
V/F	(Vd area, l/kg / F)	2.838	2.648	2.668	3.025	3.655	7.924	3.984	2.240

La biodisponibilidad porcentual (F%) promedio determinada para esta edad y vía de administración fue de 54,8 %.

Tabla IV.12.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral de marbofloxacin en terneras de 10 días (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 7	TERNERA 8	TERNERA 9	TERNERA 10	TERNERA 11	TERNERA 12	MEDIA	DESV. EST.
T _{max}	h	4.0	8.0	6.0	12.0	6.0	8.0	7.2	3.0
C _{max}	ug/ml	0.771	0.287	0.614	0.292	0.444	0.178	0.482	0.210
ABC _{last}	ug.h/ml	12.2108	9.705	15.314	9.291	10.639	7.2398	11.432	2.443
T $\frac{1}{2}$ λ	h	18.7209	23.462	16.695	12.715	16.852	25.2356	17.689	3.900
λ	1/h	0.037	0.030	0.042	0.055	0.041	0.0275	0.041	0.009
ABC _∞	ug.h/ml	13.3688	10.617	15.994	9.762	11.182	8.4051	12.185	2.512
V _z /F	l/kg	4.040	6.376	3.012	3.758	4.349	8.663	4.307	1.258
Cl/F	ml/h.kg	149.60	188.00	125.00	205.00	179.00	237.94	169.32	31.89
MRT _{last}	h	18.9959	24.534	20.982	21.913	21.664	28.3901	21.618	1.992
MRT _∞	h	25.1474	31.869	24.347	24.781	25.485	40.0393	26.326	3.127

IV.3.5. Administración intravenosa en terneras de 50 días de vida.

La tabla IV.13 muestra las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en terneras de 50 días de vida (n=6). En la figura IV.12 se muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes.

El pH de orina en estos animales fue de $7,81 \pm 1,11$.

En las tablas IV.14 y I.V.15 se muestran los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelos bicompartimental y no compartimental.

Tabla IV.13- Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacina tras la administración intravenosa en terneras de 50 días.

Tiempo (h)	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 5	TERNERA 6	TERNERA 13	TERNERA 14	MEDIA	DESV EST.
0.083	2.491	2.468	1.826	2.777	2.400	2.410	2.395	0.311
0.166	2.007	2.286	1.598	2.581	1.716	2.288	2.079	0.376
0.25	2.503	2.235	1.595	2.188	1.507	2.023	2.008	0.387
0.333	1.860	2.162	1.533	1.928	1.532	2.046	1.844	0.262
0.5	1.700	1.844	1.444	1.810	1.464	1.702	1.661	0.170
0.75	1.710	1.477	1.375	1.566	1.352	1.469	1.491	0.132
1	1.291	1.244	1.236	1.496	1.191	1.422	1.313	0.119
1.5	0.755	1.073	1.136	1.274	1.024	1.398	1.110	0.222
2	0.722	1.046	0.965	1.188	0.900	0.917	0.956	0.156
3	0.667	0.784	0.792	0.734	0.796	0.668	0.740	0.060
4	0.478	0.508	0.701	0.704	0.543	0.573	0.585	0.097
6	0.337	0.211	0.393	0.541	0.360	0.374	0.369	0.106
8	0.270	0.156	0.264	0.285	0.244	0.253	0.245	0.046
10	0.147	0.104	0.136	0.211	0.165	0.183	0.158	0.038
12	0.095	0.091	0.103	0.082	0.130	0.120	0.104	0.018
24	MLC	MLC	MLC	0.031	MLC	MLC	MLC	0.013
30	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
36	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación.

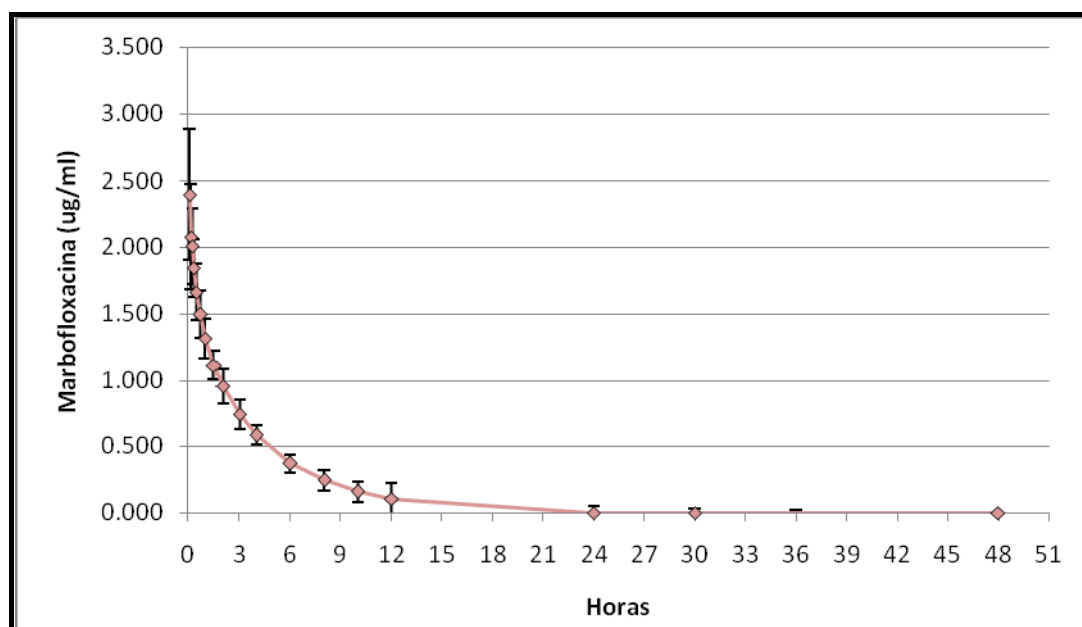


Figura IV.12- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina (Media \pm D.E.; $n=6$) tras la administración de una dosis intravenosa de 2 mg/kg en terneras de 50 días.

Tabla IV.14.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en terneras de 50 días (modelo bicompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 5	TERNERA 6	TERNERA 13	TERNERA 14	MEDIA	DESV. EST.
A	ug/ml	1.935	1.121	0.781	1.512	0.434	1.040	1.137	0.530
B	ug/ml	0.678	1.603	1.613	1.799	1.353	1.757	1.467	0.417
α	1/h	1.055	1.992	14.272	4.331	1.326	3.348	4.387	5.000
β	1/h	0.134	0.279	0.233	0.232	0.212	0.268	0.226	0.052
ABC	ug.h/ml	6.909	6.304	6.994	8.115	6.707	6.860	6.981	0.606
$t_{1/2} K10$	h	1.832	1.604	2.024	1.699	2.602	1.700	1.910	0.369
$t_{1/2} \alpha$	h	0.657	0.348	0.049	0.160	0.523	0.207	0.324	0.231
$t_{1/2} \beta$	h	5.184	2.482	2.981	2.992	3.269	2.583	3.249	0.991
K10	1/h	0.378	0.432	0.342	0.408	0.266	0.408	0.373	0.060
K12	1/h	0.437	0.552	4.470	1.696	0.216	1.006	1.396	1.595
K21	1/h	0.373	1.287	9.691	2.460	1.055	2.203	2.845	3.440
Co	ug/ml	2.613	2.725	2.395	3.311	1.787	2.797	2.605	0.503
Cl _B	ml/h.Kg	289.00	317.00	286.00	246.00	298.00	292.00	288.00	23.00
AUMC	ug.h ² /ml	39.690	20.838	29.851	33.601	30.338	24.500	29.803	6.648
MRT	h	5.745	3.306	4.268	4.141	4.523	3.572	4.259	0.857
Vd ss (area)	l/kg	1.663	1.049	1.220	1.021	1.349	1.041	1.224	0.251

Tabla IV.15.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en terneras de 50 días (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 1	TERNERA 2	TERNERA 5	TERNERA 6	TERNERA 13	TERNERA 14	MEDIA	DESV. EST.
C ₀	ug/ml	3.092	2.665	2.087	2.988	2.218	2.918	2.661	0.421
ABC _{last}	ug.h/ml	6.021	6.083	6.630	8.476	6.271	6.871	6.726	0.917
T _{1/2} λ	h	2.654	2.532	2.945	3.736	3.809	3.631	3.218	0.575
λ	1/h	0.261	0.274	0.235	0.186	0.182	0.191	0.221	0.041
ABC _∞	ug.h/ml	6.375	6.3127	7.0422	8.5753	6.941	7.505	7.125	0.838
Vz	L/kg	1.201	1.157	1.206	1.257	1.584	1.396	1.300	0.161
Cl	ml/h.kg	313.0	316.0	284.0	233.0	288.0	267.0	283.5	313.0
MRT _{last}	h	3.2554	2.8101	3.4358	4.3669	3.481	3.299	3.441	0.512
MRT _∞	h	3.9527	3.2766	4.185	4.6577	4.833	4.476	4.230	0.565
Vss	l/kg	1.240	1.038	1.188	1.086	1.393	1.193	1.189	0.124

IV.3.6. Administración oral en terneras de 50 días de vida. Dosis de 2 mg/kg.

En la tabla IV.16 y figura IV.13 se muestran las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, tras la administración oral de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en terneras de 50 días de vida (n=4). En este ensayo hubo que descartar una ternera (n° 19), la cual manifestó diarrea sanguinolenta de etiología parasitaria entre el 2° y 3° día de muestreo.

Los datos de concentración plasmática se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental (tabla IV.17). Se muestran también en la tabla I.V.18 los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelo no compartimental.

El pH de orina en terneras de 50 días de vida fue de $8,01 \pm 1,04$.

Tabla IV.16- Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacin tras la administración oral de una dosis única de 2 mg/kg en terneras de 50 días.

Tiempo (h)	TERNERA 15	TERNERA 16	TERNERA 17	TERNERA 18	TERNERA 20	MEDIA	DESV, EST,
0	0	0	0	0	0	0	0
0.166	MLC	MLC	MLC	MLC	0.029	0.097	0.097
0.33	0.027	MLC	0.036	MLC	0.049	0.111	0.011
0.5	0.043	0.041	0.068	0.025	0.054	0.046	0.016
0.75	0.042	0.035	0.110	0.029	0.059	0.055	0.033
1	0.051	0.075	0.157	0.027	0.067	0.075	0.049
1.5	0.052	0.086	0.177	0.035	0.088	0.075	0.020
2	0.071	0.087	0.181	0.045	0.085	0.094	0.052
3	0.093	0.098	0.189	0.059	0.113	0.111	0.048
4	0.095	0.090	0.222	0.074	0.124	0.121	0.059
6	0.110	0.096	0.211	0.117	0.146	0.143	0.050
8	0.124	0.131	0.214	0.133	0.149	0.150	0.037
10	0.128	0.121	0.182	0.121	0.171	0.150	0.030
12	0.077	0.117	0.109	0.109	0.196	0.122	0.044
24	0.068	0.109	0.082	0.076	0.092	0.086	0.016
30	0.057	0.094	0.056	0.053	0.074	0.067	0.017
36	0.050	0.052	0.039	MLC	0.064	0.051	0.025
48	0.025	0.029	MLC	MLC	0.031	0.030	0.001

MLC: Menor al límite de cuantificación

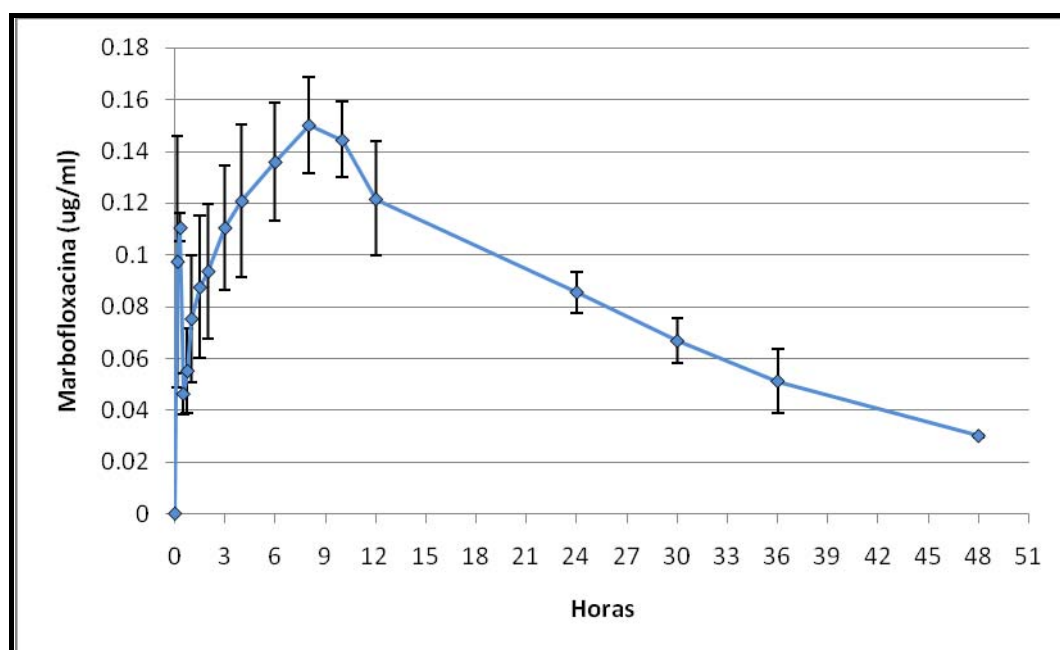


Figura IV.13- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin (Media \pm D.E.; n=5) tras la administración de una dosis oral de 2 mg/kg en terneras de 50 días.

Tabla IV.17.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral (2 mg/kg) de marbofloxacin en terneras de 50 días (modelo monocompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 15	TERNERA 16	TERNERA 17	TERNERA 18	TERNERA 20	MEDIA	DESV. EST.
T _{max}	h	7.372	6.331	3.698	10.720	10.276	7.680	2.905
C _{max}	ug/ml	0.112	0.118	0.219	0.120	0.168	0.147	0.046
ABC	(ug.h/ml)	4.166	6.463	4.850	3.989	5.113	4.916	0.982
K ₀₁	1/h	0.327	0.533	0.806	0.150	0.096	0.382	0.292
t _{1/2} K ₀₁	h	2.117	1.302	0.860	4.632	7.189	3.220	2.656
K ₁₀	1/h	0.035	0.021	0.055	0.053	0.083	0.049	0.023
t _{1/2} K ₁₀	h	19.668	33.215	12.642	13.018	8.325	17.374	9.740
CL/F	(ml/h.kg)	480.00	309.00	412.35	501.00	391.00	418.67	76.44
V/F	(Vd area, l/kg / F)	13.622	14.830	7.520	9.417	4.698	10.017	4.214

Tabla IV.18.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral (2 mg/kg) de marbofloxacin en terneras de 50 días (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 15	TERNERA 16	TERNERA 17	TERNERA 18	TERNERA 20	MEDIA	DESV. EST.
T_{max}	h	10.000	8.000	4.000	8.000	12.000	8.400	2.966
C_{max}	ug/ml	0.128	0.131	0.222	0.133	0.196	0.162	0.044
ABC_{last}	ug.h/ml	2.726	4.098	4.017	2.982	4.809	3.726	0.859
$T_{1/2\lambda}$	h	27.051	16.890	11.193	23.071	14.109	18.463	6.505
λ	1/h	0.026	0.041	0.062	0.030	0.049	0.042	0.015
ABC_{∞}	ug.h/ml	4.662	4.925	4.645	4.746	5.453	4.886	0.336
V_z/F	l/kg	16.741	9.896	6.952	14.027	7.465	11.016	4.249
Cl/F	ml/h.kg	429.00	406.00	430.56	421.00	367.00	410.71	26.30
$MRTI_{last}$	h	16.054	20.074	13.229	16.494	18.340	16.838	2.573
MRT_{∞}	h	40.550	28.853	18.488	36.117	24.251	29.652	8.874

La biodisponibilidad porcentual (F%) promedio determinada para esta edad y vía de administración fue de 68,6 %.

IV.3.7. Administración oral en terneras de 50 días de vida. Dosis de 5 mg/kg.

En la tabla IV.19 y figura IV.14 se muestran las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, tras la administración oral de una dosis de 5 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en terneras de 50 días de vida (n=5). En este ensayo hubo que descartar una ternera (nº 25) que regurgitó parte de la dosis administrada en las primeras 2 horas de muestreo.

Los datos de concentración plasmática se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental (tabla IV.20). Se muestran también en la tabla I.V.21 los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar, ajustados a modelo no compartimental.

Tabla IV.19- Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacina tras la administración oral de una dosis única de 5 mg/kg en terneras de 50 días.

Tiempo (h)	TERNERA 21	TERNERA 22	TERNERA 23	TERNERA 24	TERNERA 26	MEDIA	DESV, EST,
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.166	0.113	MLC	0.064	0.044	0.078	0.075	0.029
0.33	0.113	0.042	0.180	0.071	0.131	0.107	0.060
0.5	0.172	0.061	0.191	0.118	0.190	0.146	0.059
0.75	0.208	0.132	0.378	0.168	0.248	0.227	0.109
1	0.248	0.202	0.586	0.163	0.277	0.295	0.194
1.5	0.257	0.252	0.750	0.158	0.336	0.351	0.268
2	0.300	0.342	0.813	0.213	0.351	0.404	0.270
3	0.344	0.361	0.850	0.206	0.438	0.440	0.282
4	0.437	0.413	0.913	0.287	0.484	0.507	0.275
6	0.407	0.453	0.959	0.355	0.436	0.522	0.280
8	0.369	0.374	0.903	0.365	0.423	0.487	0.234
10	0.311	0.331	0.866	0.357	0.347	0.442	0.237
12	0.403	0.099	0.620	0.338	0.265	0.345	0.214
24	0.311	0.114	0.218	0.172	0.278	0.219	0.083
30	0.214	0.063	0.121	0.119	0.186	0.141	0.063
36	0.143	0.025	0.081	0.107	0.169	0.105	0.050
48	0.141	0.000	0.030	0.025	0.167	0.091	0.074

MLC: Menor al límite de cuantificación

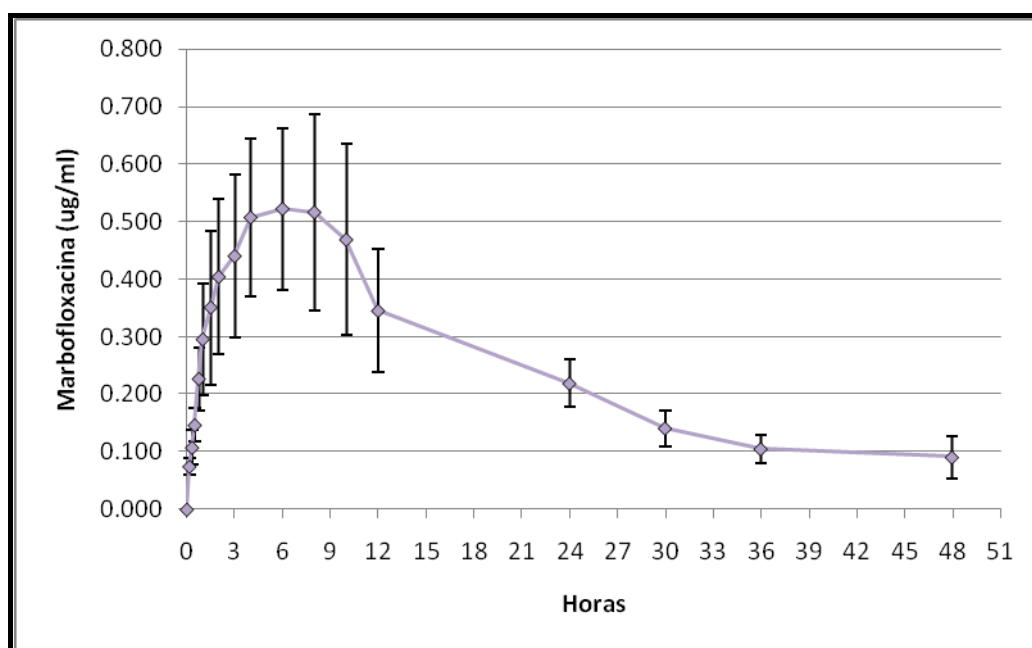


Figura IV.14- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina (Media \pm D.E.; n=5) tras la administración de una dosis oral de 5 mg/kg en terneras de 50 días.

Tabla IV.20.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral (5 mg/kg) de marbofloxacin en terneras de 50 días (modelo monocompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 21	TERNERA 22	TERNERA 23	TERNERA 24	TERNERA 26	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	7.674	6.576	4.979	8.719	5.545	6.699	1.528
Cmax	ug/ml	0.396	0.420	1.067	0.356	0.440	0.536	0.299
ABC	(ug.h/ml)	22.407	8.446	18.233	9.319	18.025	15.286	6.109
K01	1/h	0.384	0.250	0.376	0.138	0.567	0.343	0.161
t _{1/2} K01	h	1.806	2.777	1.843	5.038	1.222	2.537	1.505
K10	1/h	0.021	0.088	0.092	0.082	0.029	0.062	0.034
t _{1/2} K10	h	33.193	7.921	7.497	8.453	24.228	16.258	11.806
CL/F	(ml/h.kg)	223.15	592.00	274.23	536.55	110.95	347.38	207.55
V/F	(Vd area, l/kg / F)	10.685	6.765	2.965	6.543	3.870	6.166	3.018

Tabla IV.21.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración oral (5 mg/kg) de marbofloxacin en terneras de 50 días (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	TERNERA 21	TERNERA 22	TERNERA 23	TERNERA 24	TERNERA 26	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	6.000	8.000	6.000	8.000	8.000	7.200	1.095
Cmax	ug/ml	0.437	0.453	0.484	1.048	0.365	0.557	0.278
ABC _{last}	ug.h/ml	14.173	8.360	13.198	17.555	8.917	12.441	3.834
T _{1/2} λ	h	16.056	8.325	28.691	8.255	11.082	14.482	8.553
λ	1/h	0.043	0.083	0.024	0.084	0.063	0.059	0.026
ABC _∞	ug.h/ml	17.361	8.655	19.640	17.902	9.479	14.607	5.136
Vz/F	l/kg	6.671	6.939	4.215	3.326	8.433	5.917	2.095
Cl/F	ml/h.kg	288.00	577.72	101.83	279.30	527.49	354.80	196.00
MRT _{last}	h	21.070	14.451	19.978	12.204	16.705	16.882	3.706
MRT _∞	h	30.269	16.002	43.074	13.127	19.506	24.395	12.296

La biodisponibilidad porcentual (F%) promedio determinada para esta edad y vía de administración fue de 69,6 %.

IV.3.8. Administración intravenosa en vacas.

Se pueden observar en la tabla IV.22 las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en vacas

(n=6). En la figura IV.15 se muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes.

Los datos de concentraciones plasmáticas se ajustaron mejor a un modelo bicompartimental (Tabla IV.23). En la tabla I.V.24 también se pueden observar los parámetros farmacocinéticos, su media aritmética y desviación estándar, ajustados a modelo no compartimental.

El pH de orina en vacas fue de $8,43 \pm 0,30$.

Tabla IV.22 Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacin tras la administración intravenosa en vacas.

Tiempo (h)	VACA 1	VACA 2	VACA 4	VACA 5	VACA 6	VACA 7	MEDIA	DESV EST.
0.083	3.038	4.425	3.840	3.149	4.703	3.072	3.705	0.733
0.166	2.164	3.628	2.633	3.001	3.316	2.546	2.881	0.538
0.25	2.249	3.230	2.896	3.047	3.280	2.273	2.829	0.461
0.333	1.842	1.988	2.492	2.496	2.835	2.014	2.278	0.387
0.5	1.823	1.943	2.165	1.690	2.439	1.942	2.000	0.266
0.75	1.365	1.606	1.672	1.786	2.056	1.554	1.673	0.234
1	1.486	1.524	1.597	1.390	1.860	1.406	1.544	0.173
1.5	1.255	1.237	1.176	0.963	1.462	1.073	1.194	0.171
2	1.064	0.868	1.008	1.014	1.138	0.873	0.994	0.106
3	0.784	0.705	0.579	0.769	0.740	0.653	0.705	0.078
4	0.584	0.595	0.586	0.412	0.519	0.475	0.528	0.074
6	0.357	0.376	0.339	0.357	0.325	0.263	0.336	0.040
8	0.237	0.193	0.162	0.190	0.184	0.148	0.186	0.031
10	0.111	0.120	0.082	0.084	0.085	0.072	0.092	0.019
12	0.093	0.067	0.057	0.049	0.055	0.036	0.060	0.019
24	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
30	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
36	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación

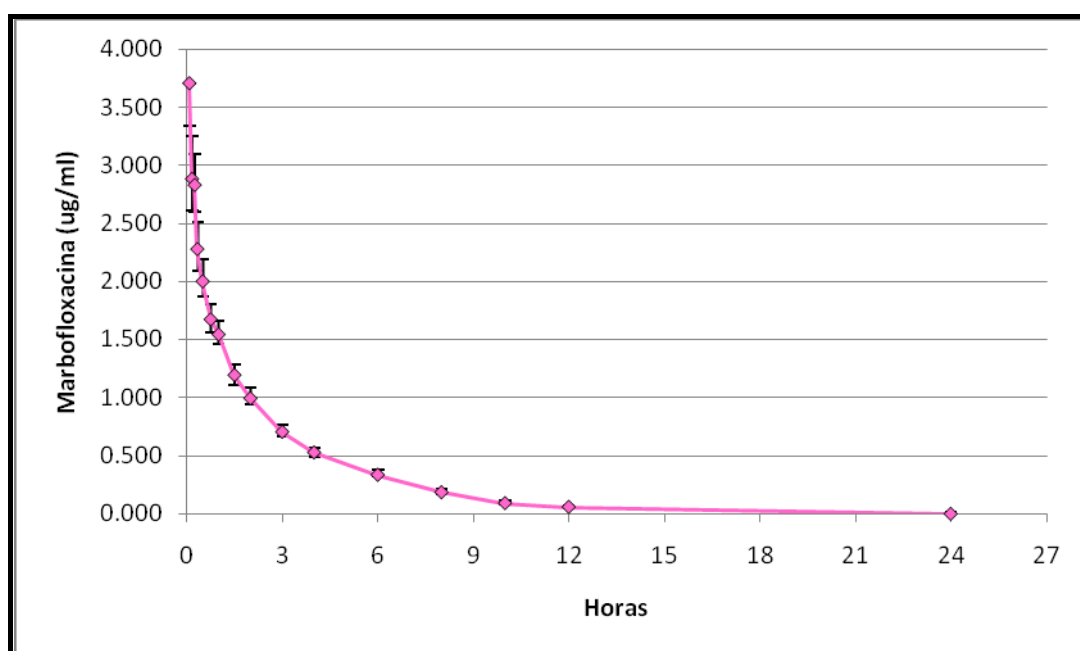


Figura IV.15- Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis intravenosa de 2 mg/kg en vacas.

Tabla IV.23.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacina en vacas (modelo bicompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 1	VACA 2	VACA 4	VACA 5	VACA 6	VACA 7	MEDIA	DESV. EST.
A	ug/ml	1.901	4.290	2.187	1.938	2.628	1.552	2.416	0.985
B	ug/ml	1.777	1.753	1.746	1.816	1.924	1.719	1.789	0.074
α	1/h	5.668	4.874	2.460	2.407	2.051	2.814	3.379	1.507
β	1/h	0.257	0.270	0.291	0.297	0.301	0.317	0.289	0.022
ABC	ug.h/ml	7.244	7.362	6.884	6.910	7.676	5.976	7.009	0.586
$t_{1/2} K_{10}$	h	1.365	0.845	1.213	1.276	1.169	1.266	1.189	0.181
$t_{1/2} \alpha$	h	0.122	0.142	0.282	0.288	0.338	0.246	0.236	0.086
$t_{1/2} \beta$	h	2.695	2.563	2.380	2.331	2.304	2.187	2.410	0.186
K ₁₀	1/h	0.508	0.821	0.571	0.543	0.593	0.547	0.597	0.113
K ₁₂	1/h	2.546	2.718	0.926	0.843	0.718	0.954	1.451	0.920
K ₂₁	1/h	2.871	1.606	1.254	1.318	1.040	1.629	1.620	0.652
Co	ug/ml	3.677	6.042	3.933	3.753	4.552	3.271	4.205	0.993
Cl _B	ml/h.Kg	276.10	271.67	290.51	289.43	260.54	334.67	287.15	25.86
AUMC	ug.h ² /ml	26.922	24.149	20.950	20.861	21.882	17.312	22.013	3.263
MRT	h	3.717	3.280	3.043	3.019	2.851	2.897	3.134	0.322
Vd ss (area)	l/kg	1.026	0.891	0.884	0.873	0.742	0.969	0.897	0.096

Tabla IV.24.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de marbofloxacin en vacas (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 1	VACA 2	VACA 4	VACA 5	VACA 6	VACA 7	MEDIA	DESV. EST.
C_0	ug/ml	4.265	5.397	5.600	3.304	6.670	3.707	4.824	1.28
ABC_{last}	ug.h/ml	6.967	7.103	6.818	6.704	7.638	5.942	6.862	0.56
$T_{1/2\lambda}$	h	2.608	2.516	2.292	2.047	2.313	1.961	2.289	0.25
λ	1/h	0.266	0.276	0.303	0.339	0.300	0.353	0.306	0.03
ABC_{∞}	ug.h/ml	7.258	7.348	6.984	6.842	7.812	6.044	7.048	0.60
V_z	l/kg	1.036	0.988	0.946	0.863	0.854	0.936	0.937	0.070
Cl	ml/h.kg	275.55	272.19	286.37	292.31	256.02	330.92	285.56	25.51
MRT_{last}	h	3.018	2.819	2.640	2.692	2.480	2.613	2.710	0.19
MRT_{∞}	h	3.528	3.247	2.941	2.940	2.766	2.818	3.040	0.29
V_{ss}	l/kg	0.972	0.883	0.842	0.859	0.708	0.932	0.866	0.091

En el muestreo de leche realizado en el ordeño solamente se detectaron concentraciones de marbofloxacin a las 8 horas del tratamiento ($0,174 \pm 0,031$ ug/ml).

Las concentraciones individuales, promedio y desvío estandar determinadas en el muestreo manual se muestran en la Tabla IV.25. Los mismos datos se grafican en la figura IV.16.

Tabla IV.25 Concentración (ug/ml) de marbofloxacin en leche tras la administración intravenosa de 2 mg/kg.

Tiempo (h)	VACA 1	VACA 2	VACA 4	VACA 5	VACA 6	VACA 7	MEDIA	DESV EST.
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.453	0.435	0.191	0.208	0.478	0.237	0.334	0.135
2	0.634	0.542	0.458	0.453	0.754	0.384	0.537	0.137
4	0.730	0.712	0.381	0.561	0.642	0.438	0.577	0.144
6	0.436	0.365	0.202	0.258	0.185	0.198	0.274	0.104
8	0.250	0.216	0.175	0.254	0.210	0.162	0.211	0.038
10	0.170	0.140	0.116	0.094	0.109	0.117	0.124	0.027
12	0.132	0.096	0.062	0.105	0.068	0.068	0.088	0.028
24	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
30	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
36	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación

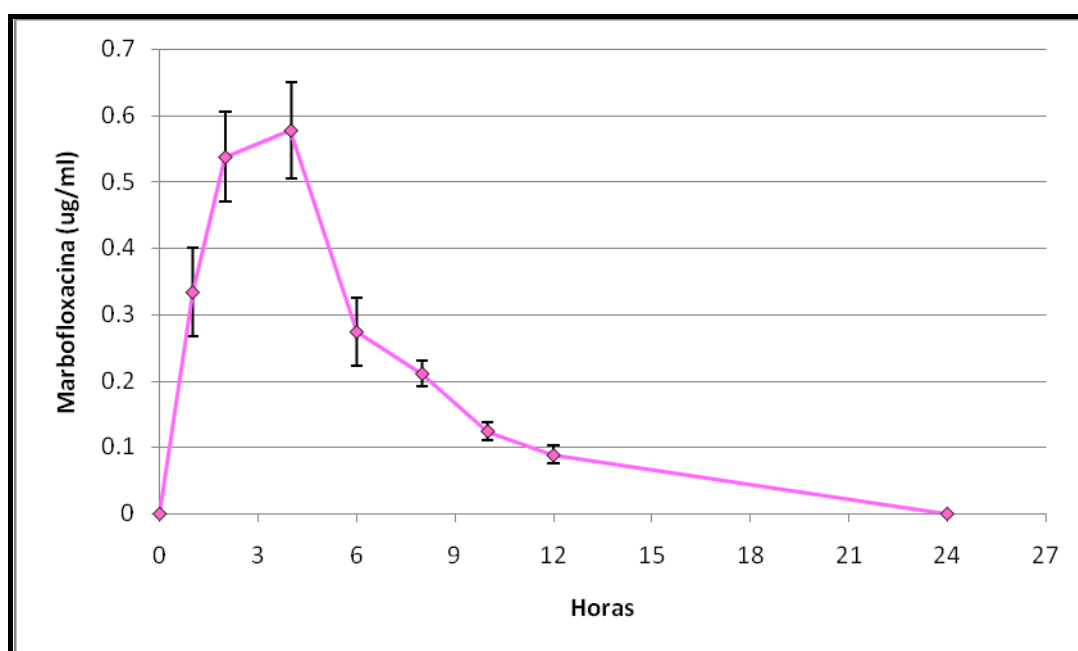


Figura IV.16- Evolución de las concentraciones de marbofloxacin en leche (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis intravenosa de 2 mg/kg.

La Tabla IV.26 muestra los parámetros farmacocinéticos determinados para estos valores.

Tabla IV.26.- Parámetros farmacocinéticos para las concentraciones lácteas de marbofloxacin en vacas tratadas por vía intravenosa (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 1	VACA 2	VACA 4	VACA 5	VACA 6	VACA 7	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	4.000	4.000	2.000	4.000	2.000	4.000	3.333	1.033
Cmax	ug/ml	0.73	0.712	0.458	0.561	0.754	0.438	0.609	0.142
ABClast	ug.h/ml	4.708	4.21	2.688	3.3265	3.969	2.711	3.602	0.829
T $\frac{1}{2} \lambda$	h	3.177	3.419	2.672	3.179	2.459	3.194	3.017	0.368
AUMClast	ug.h ² /ml	22.411	19.545	12.901	16.355	16.452	13.017	16.780	3.711
MRTlast	h	4.7602	4.6425	4.7995	4.9166	4.1451	4.8015	4.678	0.275

IV.3.9. Administración intramuscular en vacas.

Se pueden observar en la tabla IV.27 las concentraciones plasmáticas, media y desviación estándar en función del tiempo, obtenidas tras la administración intramuscular de una dosis de 2 mg/kg de peso corporal de marbofloxacin en vacas (n=6). En la figura IV.17 se muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas correspondientes.

Los datos de concentraciones plasmáticas se ajustaron mejor a un modelo monocompartimental (Tabla IV.28). En la tabla I.V.29 también se pueden observar los parámetros farmacocinéticos, su media aritmética y desviación estándar, ajustados a modelo no compartimental.

En el muestreo de leche realizado en el ordeño solamente se detectaron concentraciones de marbofloxacin a las 12 horas del tratamiento ($0,202 \pm 0,115$ µg/ml).

Tabla IV.27. Concentración plasmática (µg/ml) de marbofloxacin tras la administración intramuscular en vacas.

Tiempo (h)	VACA 3	VACA 5	VACA 8	VACA 9	VACA 10	VACA 11	MEDIA	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0
0.166	1.617	1.746	1.198	0.709	1.049	0.896	1.203	0.407
0.333	1.894	1.497	2.106	1.619	1.448	1.220	1.631	0.321
0.5	1.749	1.470	1.488	1.434	1.362	1.330	1.472	0.149
0.75	1.704	1.610	1.683	1.691	1.269	1.346	1.550	0.193
1	1.853	1.772	1.541	1.520	1.304	1.137	1.521	0.271
1.5	1.499	1.467	1.120	1.428	1.466	0.982	1.327	0.219
2	1.359	1.320	1.031	1.344	1.161	0.722	1.156	0.248
3	1.187	0.947	1.192	1.190	0.940	0.904	1.060	0.143
4	0.969	0.770	0.918	1.011	0.918	0.665	0.875	0.131
6	0.555	0.311	0.428	0.520	0.563	0.367	0.458	0.105
8	0.341	0.187	0.231	0.283	0.311	0.211	0.261	0.060
10	0.136	0.099	0.130	0.175	0.167	0.120	0.138	0.029
12	0.090	0.056	0.078	0.096	0.093	0.061	0.079	0.017
24	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
30	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
36	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación

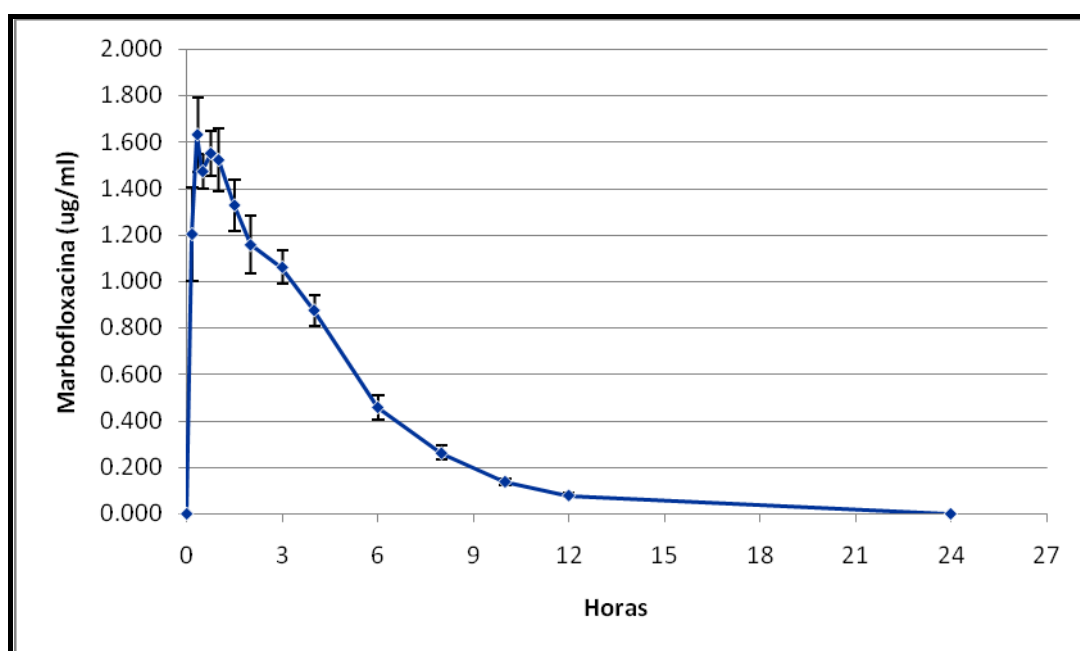


Figura IV.17 - Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis intramuscular de 2 mg/kg en vacas.

Tabla IV.28- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intramuscular de marbofloxacina en vacas (modelo monocompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 3	VACA 5	VACA 8	VACA 9	VACA 10	VACA 11	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	0.499	0.539	0.253	0.605	0.908	0.48	0.547	0.213
Cmax	ug/ml	1.900	1.633	1.828	1.672	1.391	1.29	1.619	0.239
ABC	(ug.h/ml)	9.281	8.295	7.799	9.149	8.594	6.16	8.214	1.143
K01	1/h	7.103	0.768	50.088	7.213	1.703	8.76	12.605	18.645
t½ K01	h	0.098	0.903	0.014	0.096	0.407	0.08	0.266	0.341
K10	1/h	0.230	0.400	0.241	0.203	0.219	0.23	0.254	0.073
t½ K10	h	3.019	1.733	2.882	3.420	3.165	3.00	2.870	0.587
CL/F	(ml/h/kg)	215.48	241.11	256.43	218.60	232.71	324.42	248.12	40.28
V/F	(Vd area, L/kg / F)	0.938	0.602	1.066	1.078	1.062	1.404	1.025	0.259

Las concentraciones individuales, promedio y desvío estandar determinadas en el muestreo manual de leche se muestran en la Tabla IV.30. Los mismos datos se grafican en la figura IV.18.

Tabla IV.29- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intramuscular de marbofloxacin en vacas (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 3	VACA 5	VACA 8	VACA 9	VACA 10	VACA 11	MEDIA	DESV. EST.
T _{max}	h	0.333	1.000	0.333	0.750	1.500	0.750	0.778	0.440
C _{max}	ug/ml	1.894	1.772	2.106	1.691	1.466	1.346	1.713	0.278
ABC _{last}	ug.h/ml	8.634	6.990	7.418	8.161	7.603	5.784	7.432	0.992
T $\frac{1}{2}$ λ	h	2.328	2.300	2.554	2.498	2.301	2.35	2.388	0.110
λ	1/h	0.298	0.301	0.271	0.278	0.301	0.29	0.291	0.013
ABC _∞	ug.h/ml	8.931	7.173	7.703	8.510	7.910	6.000	7.704	1.038
V _z /F	L/kg	0.752	0.925	0.956	0.847	0.839	1.130	0.908	0.130
Cl/F	ml/h.kg	223.94	279.00	259.65	235.01	252.85	333.35	263.97	39.04
MRT _{last}	h	3.451	3.029	3.375	3.589	3.727	3.52	3.448	0.238
MRT _∞	h	3.847	3.343	3.829	4.083	4.177	3.94	3.870	0.291

Tabla IV.30 Concentración (µg/ml) de marbofloxacin en leche tras la administración intramuscular de 2 mg/kg (Muestreo manual).

Tiempo (h)	VACA 3	VACA 5	VACA 8	VACA 9	VACA 10	VACA 11	MEDIA	DESV EST.
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0.085	0.215	0.140	0.079	0.130	0.118	0.128	0.049
1	0.258	0.447	0.299	0.217	0.276	0.243	0.290	0.082
2	0.726	0.707	0.490	0.463	0.544	0.419	0.559	0.129
3	0.506	0.516	0.508	0.728	0.682	0.501	0.573	0.103
4	0.536	0.523	0.536	0.616	0.665	0.566	0.574	0.056
6	0.500	0.350	0.435	0.388	0.403	0.351	0.404	0.057
8	0.185	0.177	0.274	0.311	0.322	0.249	0.253	0.062
10	0.203	0.104	0.176	0.220	0.166	0.118	0.164	0.046
12	0.144	0.075	0.108	0.155	0.111	0.087	0.113	0.031
24	0.187	MLC	MLC	0.038	MLC	MLC	0.037	0.075
30	MLC	0.053	0.025	MLC	MLC	MLC	0.013	0.022
36	MLC	MLC	0.028	MLC	MLC	MLC	0.005	0.011
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación

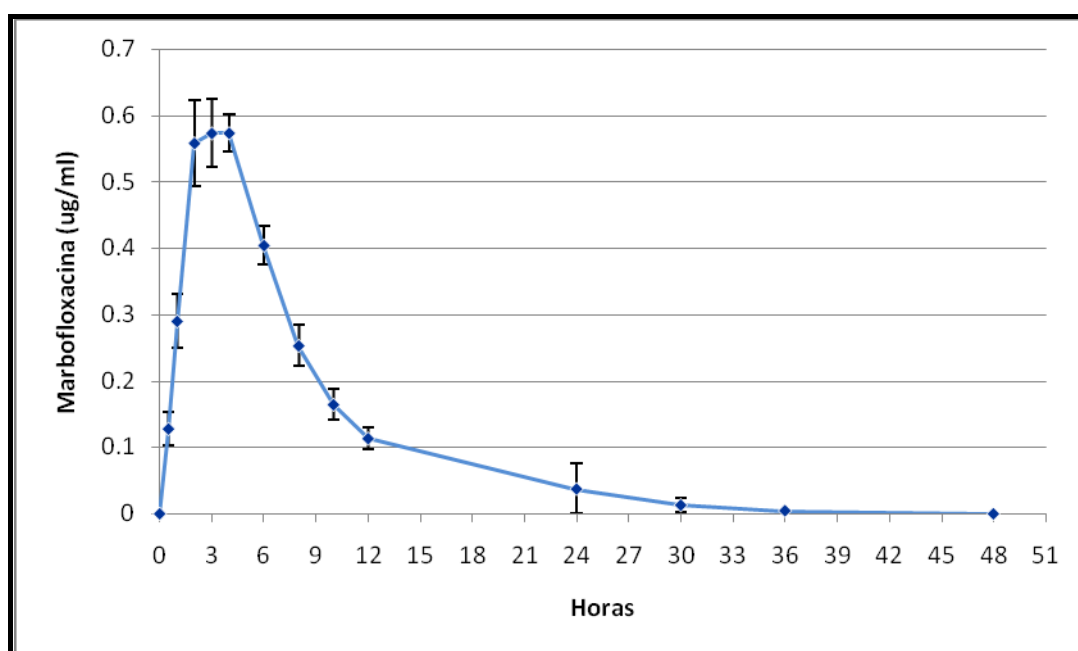


Figura IV.18- Evolución de las concentraciones de marbofloxacin en leche (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis intramuscular de 2 mg/kg.

La Tabla IV.31 muestra los parámetros farmacocinéticos determinados para estos valores.

Tabla IV.31.- Parámetros farmacocinéticos para las concentraciones lácteas de marbofloxacin en vacas tratadas por vía intramuscular (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 3	VACA 5	VACA 8	VACA 9	VACA 10	VACA 11	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	2	2	4	3	3	4	3.000	2
Cmax	ug/ml	0.726	0.707	0.536	0.728	0.682	0.566	0.658	0.726
ABClast	ug.h/ml	6.178	3.7873	5.2163	5.4683	4.3885	3.5333	4.762	6.178
T $\frac{1}{2}$ λ	h	10.758	2.719	8.492	5.656	3.103	2.866	5.599	3.082
AUMClast	ug.h ² /ml	58.444	16.501	40.163	39.512	22.003	17.548	32.362	15.114
MRTlast	h	9.460	4.357	7.699	7.225	5.013	4.966	6.454	1.820

IV.3.10. Administración intramamaria en vacas.

Luego de la administración intramamaria de 100 mg de marbofloxacin/cuarterón se determinaron los niveles plasmáticos que se observan en la tabla IV.32 y figura IV.19 (n=6).

Si bien el objetivo del uso intramamario no implica el alcance de concentraciones sistémicas terapéuticas, se procesaron cinéticamente estos datos a los fines de tener conocimiento del perfil sérico de marbofloxacin por esta vía novedosa. Cuando se procesaron los datos por modelos compartimentales, el que mejor se ajustó fue el monocompartimental abierto, con absorción de primer orden (Ver Tabla IV.32). Asimismo, los parámetros farmacocinéticos, media aritmética y desviación estándar ajustados a modelo no compartimental se muestran en la tabla I.V.33.

En la leche tomada en los ordeños, se determinó una C_{max} ($n=6$, promedio \pm D.E.) de $38,56 \pm 11,52 \mu\text{g/ml}$ en el primer muestreo post tratamiento (7 horas aproximadamente). En los ordeños subsiguientes (16, 31 y 43 horas post tratamiento aproximadamente) se determinaron valores de $0,28 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$, $0,38 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$ y $0,33 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Por su parte, las concentraciones individuales, promedio y desvío estandar determinadas en el muestreo manual se muestran en la Tabla IV.34. Los mismos datos se grafican en la figura IV.20.

Tabla IV.32. Concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de marbofloxacin tras la administración intramamaria en vacas.

Tiempo (h)	VACA 12	VACA 13	VACA 14	VACA 15	VACA 16	VACA 17	MEDIA	D.E.
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0
0.25	0.102	0.030	0.039	0.035	0.057	0.036	0.050	0.027
0.54	0.149	0.120	0.140	0.117	0.140	0.138	0.134	0.013
1	0.213	0.221	0.200	0.202	0.231	0.197	0.211	0.013
1.5	0.218	0.188	0.233	0.217	0.249	0.200	0.218	0.022
2	0.207	0.220	0.189	0.228	0.242	0.213	0.217	0.018
3	0.155	0.193	0.121	0.159	0.211	0.169	0.168	0.032
4	0.094	0.132	0.127	0.106	0.192	0.122	0.129	0.034
6	0.038	0.075	0.066	0.068	0.120	0.069	0.073	0.027
8	0.030	0.036	0.033	0.029	0.058	0.031	0.036	0.011
10	MLC	MLC	MLC	MLC	0.034	MLC	0.006	0.014
12	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
24	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
30	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación

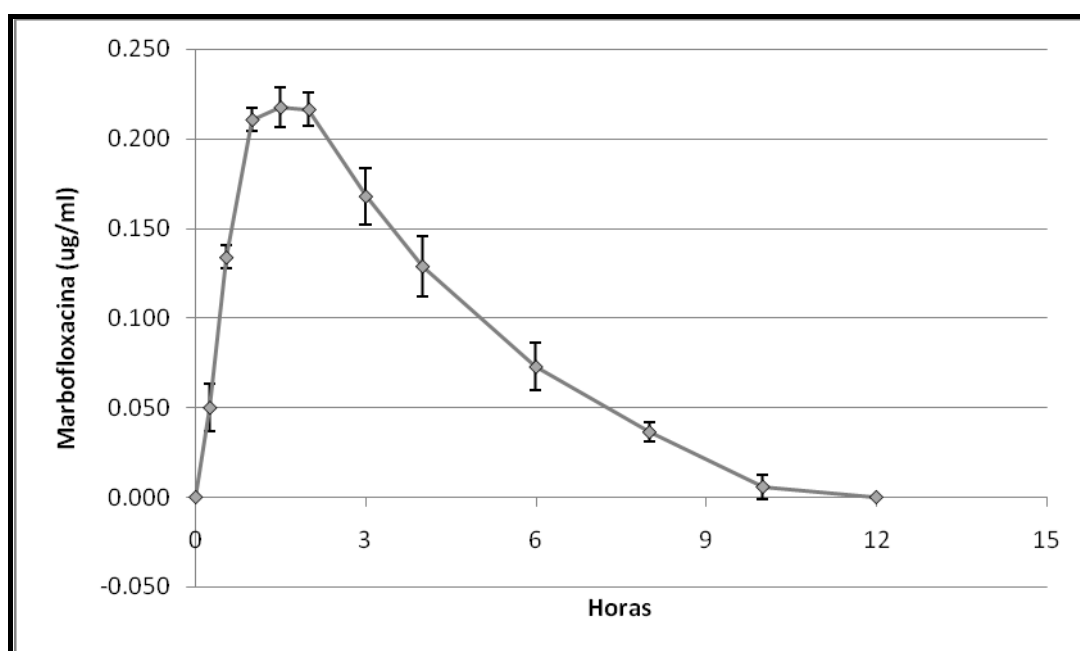


Figura IV.19 - Evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin en vacas (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis intramamaria de 100 mg/cuarterón.

Tabla IV.32- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intramamaria de marbofloxacin en vacas. (modelo monocompartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 12	VACA 13	VACA 14	VACA 15	VACA 16	VACA 17	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	1.368	1.249	1.249	1.539	1.772	1.511	1.448	0.201
Cmax	ug/ml	0.220	0.213	0.213	0.221	0.253	0.214	0.222	0.015
ABC	(ug.h/ml)	0.883	0.883	0.883	0.968	1.526	1.043	1.031	0.251
K01	1/h	1.060	1.979	1.979	1.256	1.183	1.441	1.483	0.404
t½ K01	h	0.654	0.350	0.350	0.552	0.586	0.481	0.495	0.126
K10	1/h	0.478	0.351	0.351	0.385	0.252	0.314	0.355	0.075
t½ K10	h	1.450	1.975	1.975	1.801	2.752	2.210	2.027	0.436
CL/F	(ml/h.kg)	747.40	747.41	747.41	681.92	432.52	632.56	664.87	123.09
V/F	(Vd _{area} ; l/kg / F)	1.563	2.129	2.129	1.772	1.717	2.017	1.888	0.237

Tabla IV.33- Parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intramamaria de marbofloxacin en vacas (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 12	VACA 13	VACA 14	VACA 15	VACA 16	VACA 17	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	1.500	1.500	1.500	2.000	1.500	2.000	1.667	0.258
Cmax	ug/ml	0.218	0.224	0.233	0.228	0.249	0.213	0.228	0.013
ABC _{last}	ug.h/ml	0.852	0.970	0.834	0.913	1.374	0.937	0.980	0.200
T $\frac{1}{2}$ λ	h	2.047	2.208	2.446	2.097	2.342	2.075	2.202	0.161
λ	1/h	0.339	0.314	0.283	0.331	0.296	0.334	0.316	0.022
ABC _∞	ug.h/ml	0.927	1.089	0.950	1.006	1.488	1.034	1.082	0.207
Vz/F	l/kg	2.103	1.930	2.450	1.985	1.498	1.910	1.979	0.308
Cl/F	ml/h.kg	712.27	606.04	694.55	656.18	443.58	638.24	625.14	96.82
MRTI _{last}	h	2.745	3.181	3.030	3.055	3.775	3.106	3.149	0.341
MRT _∞	h	3.407	4.058	4.071	3.792	4.511	3.848	3.948	0.367

Tabla IV.34 Concentración (µg/ml) de marbofloxacin en leche tras la administración intramamaria (muestreo manual).

Tiempo (h)	VACA 12	VACA 13	VACA 14	VACA 15	VACA 16	VACA 17	MEDIA	DESV. EST.
0.25	446.03	379.33	537.96	631.34	253.06	404.14	441.98	131.25
0.5	241.71	366.02	288.26	245.21	158.40	305.32	267.49	70.19
1	305.10	104.19	94.29	216.04	116.18	242.51	179.72	87.20
1.5	218.63	47.06	58.67	116.59	144.84	112.13	116.32	62.32
2	522.45	477.54	132.31	394.31	128.93	410.26	344.30	171.85
3	137.10	93.51	108.45	108.26	150.98	185.39	130.61	34.13
4	79.08	53.44	81.61	52.19	121.05	156.23	90.60	40.76
6	104.33	64.21	64.25	49.83	296.16	185.99	127.46	96.38
8	203.49	13.80	10.02	8.45	115.04	38.44	64.87	79.03
10	6.00	7.02	3.77	6.58	7.22	5.34	5.99	1.29
12	2.99	3.67	2.98	2.59	4.00	2.45	3.11	0.61
24	MLC	MLC	MLC	MLC	0.36	MLC	0.06	0.15
30	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-
48	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	-

MLC: Menor al límite de cuantificación

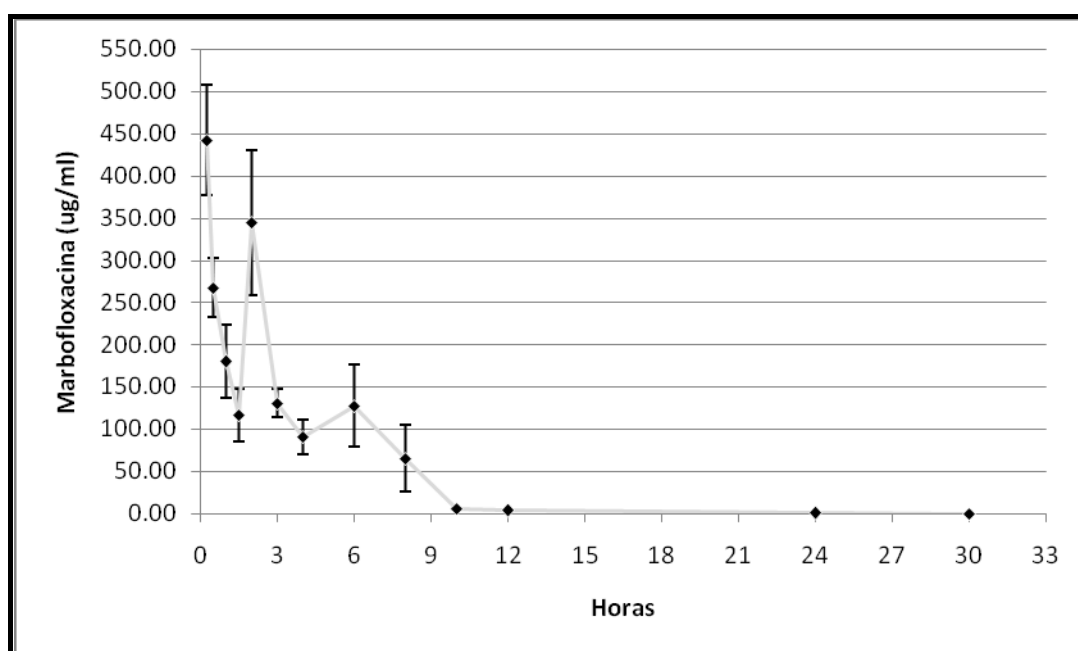


Figura IV.20- Evolución de las concentraciones de marbofloxacin en leche (Media \pm D.E.; n=6) tras la administración de una dosis intramamaria de 100 mg/cuarterón.

La Tabla IV.34 muestra los parámetros farmacocinéticos determinados con las concentraciones lácteas en esta vía de administración.

Tabla IV.34.- Parámetros farmacocinéticos para las concentraciones lácteas de marbofloxacin en vacas tratadas por vía intramamaria (modelo no compartimental).

PARAMETRO	UNIDAD	VACA 12	VACA 13	VACA 14	VACA 15	VACA 16	VACA 17	MEDIA	DESV. EST.
Tmax	h	2	2	0.25	0.25	6	2	2.083	1.918
Cmax	ug/ml	522.44	477.54	537.96	631.34	296.15	410.26	479.28	105.45
ABClast	ug.h/ml	1845.09	1062.40	933.70	1233.86	1573.77	1649.15	1383.00	328.54
T $\frac{1}{2} \lambda$	h	0.657	2.091	1.623	1.694	0.883	0.926	1.313	0.518
AUMClast	ug.h ² /ml	6722.98	2672.95	2234.67	2406.04	7171.64	5379.97	4431.30	2068.80
MRTlast	h	3.64	2.51	2.39	1.95	4.55	3.26	3.05	0.87

IV.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En las Tablas IV.35 y IV.36 se pueden observar los resultados de la comparación estadística (ANOVA con post test Bonferroni) de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por el método no compartimental en terneros.

En la vía intravenosa se compararon las terneras de distintas edades entre sí y vacas. En la vía oral se compararon los valores obtenidos en terneras de diferentes edades y además en animales de 50 días de vida se tuvieron en cuenta los valores obtenidos con las dos dosis utilizadas (2 y 5 mg/kg).

Tabla IV.35.- Comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración intravenosa (modelo no compartimental).

	C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	ABC_{last} ($\text{hr} \cdot \mu\text{g}/\text{ml}$)	ABC_{∞} ($\text{hr} \cdot \mu\text{g}/\text{ml}$)	V_z (L/kg)	$t_{1/2} \lambda$ (h)	CI (ml/h/kg)	MRT_{last} (h)	MRT_{∞} (h)	V_{ss} (L/kg)
NEONATOS vs 10 DIAS	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NEONATOS vs 50 DIAS	ns	$P < 0.01$	$P < 0.01$	ns	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	ns
NEONATOS vs VACAS	ns	$P < 0.001$	$P < 0.01$	ns	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	ns
10 DIAS vs 50 DIAS	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	ns	$P < 0.05$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.05$	ns
10 DIAS vs VACAS	ns	$P < 0.05$	$P < 0.05$	ns	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.01$	ns
50 DIAS vs VACAS	$P < 0.05$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabla IV.36.- Comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración oral (modelo no compartimental).

	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	ABC_{last} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	ABC_{∞} ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	V_z/F (l/kg)	$t_{1/2} \lambda$ (h)	CI/F (ml/h.kg)	MRT_{last} (h)	MRT_{∞} (h)
NEONATOS vs 10 DIAS	ns	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	ns	ns	ns	ns	ns
NEONATOS vs 50 DIAS 2 mg/kg	ns	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	ns	$P < 0.01$	ns	ns
10 DIAS vs 50 DIAS 2 mg/kg	ns	ns	ns	ns	$P < 0.01$	ns	$P < 0.01$	ns	ns
50 DIAS 2mg/kg vs 5 mg/kg	ns	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.05$	ns	ns	ns	ns

En vacas se compararon los valores de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos para las vías intravenosa e intramuscular (T de Students, Nivel de significancia= 0,05), determinándose únicamente significancia estadística para el tiempo medio de residencia (MRT_{last} : $P<0.001$, MRT_{∞} : $P<0.01$.)

La comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en base a los perfiles de marbofloxacin en leche determinados luego de la administración por vía intravenosa, intramuscular o intramamaria, se pueden observar en la Tabla IV.37.

Tabla IV.37.- Comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en base al perfil lácteo de marbofloxacin. (modelo no compartimental).

	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	ABC_{last} ($\mu\text{g.h /ml}$)	$t'_{1/2 \lambda}$ (h)	MRT_{last} (h)
INTRAVENOSA vs. INTRAMUSCULAR	ns	ns	ns	ns	ns
INTRAVENOSA vs. INTRAMAMARIA	ns	$P<0.001$	$P<0.001$	ns	ns
INTRAMAMARIA vs. INTRAMUSCULAR	ns	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.01$	$P<0.01$

IV.5. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION INHIBITORIA MÍNIMA PARA *S. AUREUS* Y CÁLCULO DE PARÁMETROS INDICADORES DE EFICACIA ANTIMICROBIANA.

En la Tabla IV.38 se muestran los valores de CIM determinados para las 163 cepas analizadas. En el apartado *Anexos* se detallan los valores obtenidos para cada cepa en particular, junto a los resultados de su enfrentamiento con los discos de antibiograma.

Tabla IV.38. Concentraciones inhibitorias mínimas determinadas para las cepas de *S. aureus* aisladas.

<i>N° de cepas</i>	<i>CIM</i>	<i>Porcentaje sobre el total</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
2	0,125 µg/ml	1,2 %	1,2 %
28	0,25 µg/ml	17,1 %	18,3 %
60	0,5 µg/ml	36,8 %	55,1 %
73	1 µg/ml	44,8 %	100 %
TOTAL: 163			

De acuerdo a estos resultados, se determinó una CIM₅₀ de 0,5 µg/ml y una CIM₉₀ de 1 µg/ml. Asimismo, con estos valores fueron estimados los parámetros indicadores de eficacia antimicrobiana (Tabla IV.39).

Tabla IV.39. Parámetros indicadores de eficacia determinados en base a las concentraciones lácteas de marbofloxacinina determinados en cada vía de administración.

	Vía de administración		
	Intravenosa	Intramuscular	Intramamaria
C _{max} / CIM ₉₀	0,17	0,65	479,28
ABC _{0-last} / CIM ₉₀ (h)	0,72	4,67	1383,00

V – DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. MATERIAL

Material biológico

Los animales empleados en el estudio fueron bovinos sanos, hembras, de raza Holando Argentino, siendo las terneras de 24 a 40 horas de vida (identificadas como neonatas), 9 a 12 días de vida (identificadas como 10 días) y de 47 a 55 días de vida (identificadas como 50 días). Por su parte, las vacas eran de 2,5 a 7 años de vida, 3ª a 5ª lactancia y 548 a 637 kg de peso vivo.

Todos los animales que participaron en la experimentación (terneras por un lado y vacas adultas por otro) se manejaron de acuerdo a las condiciones del tambo al que pertenecían, y fueron alimentados similarmente según su edad. Esta selección de los individuos se realizó siguiendo el principio que indica que la homogeneidad en el grupo de animales empleados para estudios farmacocinéticos en los que no se utiliza un gran número de sujetos es un factor importante para poder reducir al mínimo la variabilidad interindividual.

El protocolo de utilización de los animales para la experimentación fue aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Dicho Comité evaluó el diseño experimental del proyecto de tesis, teniendo en cuenta las cuestiones éticas y de bienestar animal en las pautas de utilización de los animales, así como también la seguridad del personal involucrado en el manejo de los mismos.

La selección de los animales siguió un sistema de prioridades para intentar conservar la uniformidad del grupo. De esta manera, se tuvieron en cuenta los siguientes factores:

El **estado de salud** se consideró como condición esencial para la inclusión de los sujetos en el grupo de estudio. Cualquier indicio sobre

posibles afecciones en el estado general, la función circulatoria, gastrointestinal, hepática o renal de los animales sería considerado como causa de exclusión.

El **sexo** de los animales, no es un factor que influya en la farmacocinética de las fluoroquinolonas, como ha sido demostrado ampliamente, por lo que se eligieron solo hembras como grupo más representativo de la población en estudio (Stroshane y col., 1990; Granneman y Guay, 1991; Nakagawa y col., 1995; Okuyama y col., 1997; Efthymiopoulos y col., 1997a; Yun y col., 1997; Poher y Blanc, 1998).

La **edad** de los animales adultos se escogió de manera tal que se conformara un grupo homogéneo. Por su parte, las terneras se utilizaron en las edades mencionadas en función de la maduración de los sistemas excretores (renal, hepático) y del desarrollo anátomo-fisiológico del sistema digestivo.

La función renal no está completamente desarrollada al momento del nacimiento en mamíferos. Esto puede resultar en una excreción reducida de los fármacos. Sin embargo, los rumiantes al momento del nacimiento poseen un sistema excretor renal considerablemente más maduro que otras especies (De Backer, 1986). Específicamente en bovinos, la actividad excretora, tanto por filtración glomerular como por secreción tubular activa, madura rápidamente en el período neonatal, alcanzando los valores de adulto en aproximadamente 48 horas de vida (Schwark, 1992). Considerando que marbofloxacin es un fármaco que se elimina en amplia proporción por orina, principalmente en terneros prerrumiantes (75 % vs 54 % en vacas), se trabajó con animales de menos de 48 horas de vida para estudiar la influencia de esta inmadurez renal sobre la cinética (Thomas y col., 1994a).

En cuanto al metabolismo hepático, ha sido ampliamente estudiado que el grado de desarrollo al nacimiento es diferente para cada una de las vías metabólicas; así la actividad oxidativa del sistema microsomal citocromo P-450 al igual que las reacciones de glucuronoconjugación están poco desarrolladas en neonatos, en tanto que la capacidad de acilación y

conjugación con sulfatos y glicina en el recién nacido es similar a la de los adultos (de Backer, 1986).

El metabolismo oxidativo en terneros se desarrolla de manera gradual, siendo similar al de los adultos entre las 3 y 12 semanas de vida (Nouws, 1992). Es importante consignar que la naturaleza del fármaco al igual que la composición del alimento afectan el desarrollo del metabolismo oxidativo a nivel hepático, así la ingesta de alimentos toscos estimula los procesos de oxidación, mientras que la alimentación con leche parece demorarla. En terneros, se ha demostrado que existe una baja capacidad oxidativa durante los primeros días de vida para varias sulfamidas (Nouws y col., 1988).

En cuanto al desarrollo del sistema digestivo, en los rumiantes el desarrollo del estómago es incompleto al momento del nacimiento, pudiéndose dividir en general en tres etapas: del nacimiento a las tres semanas de edad, donde el rumen y el retículo no son funcionales; de tres a ocho semanas, aquí los proventrículos inician su desarrollo y de las ocho semanas en adelante, cuando estos órganos son por completo funcionales (Gürtler y col., 1987).

En los terneros recién nacidos pueden distinguirse ya claramente las cuatro cavidades del sistema de proventrículos y estómago. En ese momento corresponde al abomaso entre el 56 al 62% del volumen total del complejo gástrico. Como resultado de la ingestión de alimentos vegetales, se produce después un notable desarrollo de los proventrículos, de manera que a la edad de 4 semanas constituyen, el rumen y el retículo, el 64% del volumen gástrico total, cifra que se eleva al 75% a las 12 semanas. En los animales adultos esta proporción acaba por ser del 87% del volumen total (Gürtler y col., 1987).

Para conservar la uniformidad del sistema experimental se seleccionaron animales que pertenecieran a una misma **raza**. Se escogió la raza Holando Argentino por ser la más representativa de la población, ya que es la raza lechera más numerosa en la Argentina (se estiman 500.000 cabezas al año 2010).

Dada la homogeneidad del grupo en estudio y de los resultados obtenidos, puede considerarse que el **número de animales** utilizados (6 para cada edad y/o vía de administración) fue suficiente para la realización del estudio farmacocinético. Debido a razones éticas se buscó trabajar con un número reducido de animales, que, a su vez, permitiera llevar a cabo un estudio válido desde el punto de vista estadístico. El número de individuos empleados fue similar al utilizado en otros trabajos que habían sido desarrollados con este fármaco en distintas especies (Petracca y col., 1993; Thomas y col., 1994a; Cester y col., 1996; Schneider y col., 1996; Martínez Larrañaga y col., 1997a; Marbofloxacin Reference Book, 1999; Tafur Garzón, 2000; García Montijano y col., 2001; Heinen, 2000; Schneider y col., 2000), así como al utilizado en trabajos posteriores con marbofloxacin (Albarellos y col., 2005; Waxman Dova y col., 2007; Luders y col., 2012).

Fármacos y productos biológicos, reactivos e instrumentación

El patrón y la especialidad farmacéutica de marbofloxacin fueron provistos por el Laboratorio de Especialidades Veterinarias Vetoquinol (Lure, France). Para la manipulación y almacenamiento de los mismos se siguieron las instrucciones recomendadas por dicho laboratorio, resguardando en todo momento el producto de la luz solar, debido a su fotosensibilidad.

El patrón interno ofloxacin utilizado fue un estandar de calidad de referencia internacional (Sigma).

Para la realización del estudio por vía intramamaria se preparó una forma farmacéutica (pomos) debido a la inexistencia de un preparado comercial de marbofloxacin para ser administrado por esta vía. Los pomos se formularon en una base oleosa, similar a la utilizada en otros productos comerciales. Con el fin de verificar la inocuidad de la forma farmacéutica elaborada, previamente a la realización de los ensayos se la administró a tres vacas no incluidas como animales experimentales. En cada vaca se practicó recuento de células somáticas (RCS) y semiología antes y después del tratamiento, verificándose que el producto no produjo irritación de la glándula mamaria.

Se realizaron controles periódicos de mantenimiento, calibrado y limpieza de los aparatos utilizados para la detección y el procesamiento de las muestras siguiendo las recomendaciones de uso y las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Con este sistema se intentó asegurar la máxima calidad de los productos a utilizar, el buen estado de los instrumentos y, por tanto, la fiabilidad de los datos obtenidos.

V.2. MÉTODOS

V.2.1. Protocolos de administración del fármaco, obtención y acondicionamiento de las muestras.

Para las vías intravenosa e intramuscular se escogió la dosis de 2 mg/kg, teniendo en cuenta las recomendaciones del laboratorio elaborador, la EMEA, y los resultados de estudios previos en bovinos (Thomas y col., 1994a; Thomas y col., 2001; Marbofloxacin Reference Book, 1999, Sidhu y col., 2005; Sidhu y col., 2010). De esta forma se podría realizar un estudio comparativo con los resultados obtenidos por otros autores y con las condiciones de utilización clínica (o de campo) mas frecuentes.

En cuanto a la vía oral, si bien el laboratorio elaborador de los bolos recomienda una dosis de 1 mg/kg para el tratamiento de patologías digestivas en terneros (Marbofloxacin Reference Book, 1999), en nuestro trabajo elegimos una dosis de 2 mg/kg, considerando la escasa biodisponibilidad *per os* de las quinolonas en rumiantes, lo cual fue confirmado por diversos autores. Elmas y col. (2000) obtuvieron una biodisponibilidad oral de 23 % tras la administración de enrofloxacin en cabras. En terneros, el ácido oxolínico mostró una absorción pobre y dependiente de la dosis (Ziv, 1976) y tras la administración oral de 5 mg/kg de danofloxacin se obtuvieron niveles plasmáticos iguales o inferiores a su nivel mínimo de detección (0,05 µg/ml) en todas las muestras, lo que podría deberse a la dilución del fármaco en el volumen retículo ruminal o a su posible unión a la ingesta (Mann y Frame, 1992). De manera similar

González y col. (1997) observaron tras la administración oral de norfloxacin en ovejas una biodisponibilidad de 4,04 % y sugieren que la quelación con cationes multivalentes presentes en el rumen o a la adsorción al contenido ruminal podrían explicar este resultado. Considerando esto, una dosis superior fue utilizada en nuestros ensayos, con el objetivo de alcanzar niveles plasmáticos mensurables y determinar, en base al perfil obtenido, el posible uso de esta vía en el tratamiento de infecciones sistémicas.

En el caso del ensayo en terneras de 50 días de vida, se utilizó, además, una dosis aun mayor, 5 mg/kg, previendo una biodisponibilidad más reducida, a medida que el sistema digestivo está más desarrollado.

Para la determinación de la dosis intramamaria (100 mg/cuarterón), al no tener referencias previas de ningún tipo con quinolonas, se realizó un cálculo de la producción láctea y las concentraciones necesarias que se debían alcanzar para conseguir unos niveles que al menos superasen la CIM₉₀ para *S. aureus* previamente reportada por otros autores (0,229 µg/ml) (Schneider y col., 2004).

Las vías de administración se seleccionaron de acuerdo con las recomendadas por el laboratorio elaborador (Marbofloxacin Reference Book, 1999) y siguiendo los criterios utilizados en otros trabajos (Shojaee Aliabadi & Lees, 2002; Schneider y col., 2004, Sidhu y col., 2010).

La vía intramamaria no es utilizada con frecuencia o incluso en algunos países no está autorizada para la aplicación de fluoroquinolonas. No obstante puede ser necesario su empleo en el tratamiento de mastitis resistentes a otros antimicrobianos y ser reservada sólo para casos de extrema necesidad en que los estudios de sensibilidad sobre patógenos responsables de una mastitis así lo demanden. Asimismo, marbofloxacin ha demostrado excelente actividad *in vitro* frente a diferentes patógenos mamarios en bovinos (Ganiere y col., 2004; Meunier, D., Schneider y col., 2004). Por esta razón, se decidió estudiar el comportamiento de una formulación de uso intramamario, comparar los niveles lácteos del antimicrobiano con aquellos obtenidos por vía intravenosa e intramuscular, y determinar parámetros indicadores de eficacia frente a un patógeno de

elevada incidencia en la mastitis bovina como *S. aureus*.

El protocolo que se siguió para la toma de muestras, a tenor de los resultados obtenidos, abarcó todo el período en el que se pudieron detectar concentraciones plasmáticas, hasta valores por debajo del límite de cuantificación. Esto ha permitido definir las constantes de eliminación, llegando al menos a obtener 3 semividas de eliminación, coincidiendo con el protocolo que siguen muchos autores para las fluoroquinolonas (Martínez Larrañaga y col., 1997b; Shojaee Aliabadi & Lees, 2002, de Lucas y col., 2004; Carretero y col., 2002; García-Montijano y col., 2006)) e igualmente siguiendo las recomendaciones de la Buenas Prácticas Clínicas (GCP: CVMP/VICH/595/98-FINAL, 1998) y de Laboratorio (GLP: Community legislation in Directives 87/18/EEC13, 1986 y Community legislation in Directives 88/320/EEC14, 1988).

En cuanto a la toma de muestras de leche, diversos autores utilizaron un muestreo por vaciado completo de la glándula mamaria (Shem-Tov y col., 1998; Haritova y col., 2003), en nuestro trabajo, ante la imposibilidad de vaciar la mama en cada muestreo (los animales eran ordeñados cada 12 h aproximadamente, rutina que no debía ser alterada en el establecimiento lechero utilizado), se decidió tomar muestras manuales a intervalos más cortos, tratando de obtener una muestra representativa de la leche de los cuatro cuartos mamarios, y también una muestra en cada ordeño posterior a la administración (un total de cuatro a cinco ordeños). De esta forma se pudo comparar si ambos muestreos eran similares en cuanto a los niveles de fármaco determinado.

V.2.2. Metodología analítica.

La mayoría de los métodos para el análisis de quinolonas están basados en el empleo de cromatografía líquida, aunque existen otras técnicas como la absorción molecular, la espectrofluorometría, la espectrometría de masas, la electroforesis capilar, las técnicas electroanalíticas, el método microbiológico y la cromatografía de gases.

Los métodos espectrofotométricos se basan en la gran absorción de

radiación ultravioleta que presentan las quinolonas, ya que estas muestran dos bandas de absorción: una entre 300-305 nm común para todas las quinolonas y otra de 245-290 nm específica para cada quinolona.

Los métodos espectrofluorimétricos se basan en la capacidad de las quinolonas de presentar fluorescencia nativa con un espectro de emisión de 350-400 nm para las quinolonas ácidas y de 440-500 nm para las quinolonas anfóteras.

Hay que tener en cuenta que a medida que aumenta el pH del medio la intensidad de fluorescencia disminuye hasta el punto de que la quinolona no presenta fluorescencia nativa. Este método tiene mayor sensibilidad y selectividad que el anterior.

La espectrometría de masas tiene la ventaja de poder trabajar con límites de detección muy bajos, pero prácticamente, sólo se utiliza para estudios de residuos o impacto medioambiental, ya que para estudios farmacocinéticos no compensa, entre otros factores, por la relación costo-beneficio.

La utilización de métodos electroanalíticos se basa en la presencia en las quinolonas de un grupo carbonilo adyacente a un grupo carboxilo, que permite la realización de estudios electroquímicos; entre ellos podemos citar la polarografía clásica de barrido simple (SSP), la oscilopolarografía (SSOP), la polarografía pulsante diferencial (DPP), la voltamperometría de resolución adsorptiva (AdSV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV), que son utilizadas fundamentalmente para el estudio de preparados farmacéuticos y fluidos biológicos.

También se ha utilizado la cromatografía de gases, pero las quinolonas son sustancias muy polares y no volátiles que se descomponen por efecto de las altas temperaturas, por lo que para su análisis se deben obtener previamente derivados volátiles (Hassouan, M. K., 2006).

En nuestro trabajo, se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta-visible (HPLC/uv) para la detección y cuantificación de la molécula en estudio, siguiendo, la metodología descrita previamente por Waxman y col. (2001), aunque modificando el flujo y el tipo de columna utilizada, mejorando de esta forma la resolución de los picos y la separación frente al solvente y patrón interno.

Debido a que tanto la marbofloxacin es una fluoroquinolona que

presentan una elevada absorbancia ultravioleta y buenas condiciones cromatográficas, son numerosos los autores que han empleado esta técnica para cuantificar las concentraciones plasmáticas en diferentes especies (Bregante y col., 1999; Bidgood y Papich., 2005; Dimitrova y col., 2007; de Lucas y col., 2008; Abo-El-Sooud y col., 2009).

El porcentaje de recuperación obtenido en plasma en nuestro estudio ($106,9 \pm 26,8$ %), fue superior al reportado para otras quinolonas por Bregante y col. en 1999 (78 % y 86 % para enrofloxacin en cabras y vacas, respectivamente), Bermingham y col. en 2002 (en ovejas, 75 % para la enrofloxacin y 60 % para la ciprofloxacina), Waxman y col. en 2000 (marbofloxacina en cabras 91 %), Schneider y col. en 2004 (70 % para marbofloxacina en vacas) y Sidhu y col. en 2010 (95,2 % para marbofloxacina en terneros).

En nuestro método cromatográfico y con el objetivo de controlar las posibles variaciones que pudieran producirse durante los procesos de extracción, desecación y detección, se utilizó como patrón interno ofloxacina, ya que sus características físico-químicas son muy similares a las de marbofloxacina. La ofloxacina también presentó una correcta absorbancia, permitiendo una adecuada separación de las moléculas a estudiar según su tiempo de retención (6,50 min. marbofloxacina y 7,95 min. ofloxacina, aproximadamente) y por tanto, una fácil identificación de las moléculas.

Las pruebas de validez del método analítico (linealidad en fórmico entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$: $r^2 = 0,99$; reproducibilidad: C.V. interdía_{plasma} = 4,397 %, C.V. intradía_{plasma} = 4,040 %; C.V. interdía_{leche} = 2,941 %; C.V. intradía_{leche} = 1,393 % y límite de cuantificación: 0,025 $\mu\text{g/ml}$ tanto en plasma como leche) mostraron resultados satisfactorios. Las concentraciones utilizadas para comprobar la linealidad entre las distintas concentraciones de marbofloxacina y el área bajo la curva cromatográfica correspondiente se escogieron de manera tal que abarcara el intervalo de concentraciones plasmáticas esperadas, en función de las registradas en los estudios farmacocinéticos de marbofloxacina realizados en otras especies (Petracca y col., 1993; Cester y col., 1996; Schneider y col., 1996; Martínez Larrañaga y col., 1997a; Marbofloxacina Reference Book, 1999), así como

también en bovinos (Thomas y col., 1994a; Shojaee Aliabadi & Lees, 2002, Sidhu y col., 2010). Las concentraciones plasmáticas obtenidas se encontraron dentro del rango de concentraciones escogido para la validación del método analítico.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método analítico resultó un procedimiento útil y adecuado para la detección y cuantificación de la marbofloxacina.

V.2.3. Tratamiento farmacocinético y estadístico

Los datos obtenidos de concentraciones plasmáticas, se sometieron a diferentes tipos de modelos farmacocinéticos. Con objeto de comparar las diferentes edades entre sí, se eligió un modelo no compartimental, considerando que brinda parámetros farmacocinéticos más robustos y con menos artificio matemático (Kinabo & McKellar, 1989). No obstante y con el fin de tener un conocimiento más preciso del comportamiento de la molécula en esta especie, todos los datos también fueron analizados por modelos compartimentales, siguiendo los criterios de Akaike y de Schwarz (seleccionando los valores mínimos), el índice de correlación (seleccionando los valores más altos) y estándar de residuales que indica la relación entre lo observado y lo predicho.

Si bien el número de animales que se utiliza en ensayos farmacológicos es reducido, basándose en los resultados del estudio de normalidad realizados (Kolmogorov-Smirnov), la distribución de datos en los grupos ensayados era normal, por lo cual se utilizaron test paramétricos para la comparación estadística.

V.3. FARMACOCINÉTICA DE MARBOFLOXACINA POR VÍA INTRAVENOSA.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacina tras la administración intravenosa mostró un perfil bifásico, con una rápida caída (1 hora, aproximadamente), para luego disminuir de forma más lenta. El

modelo que mejor describió este comportamiento fue el bicompartimental abierto con eliminación de primer orden, mostrando todos los individuos un mejor ajuste a este modelo. Los datos publicados sobre la farmacocinética de marbofloxacin por vía intravenosa por otros autores, coinciden en señalar un comportamiento bicompartimental, tanto en caprinos (Waxman y col., 2004), bovinos (Thomas y col., 1994a), caninos (Schneider y col., 1996; Cester y col., 1996), felinos (Albarells y col., 2005) y ovinos (Shem-Tov y col., 1997a). Por otro lado, Schneider y col. (2000) en conejos e Idowu y col. (2010) en bovinos adultos, determinaron que el modelo que describe mejor la cinética intravenosa es el tricompartmental. Teniendo en cuenta que los protocolos de extracción de muestras fueron similares, no se puede atribuir la diferencia en el modelo que mejor describe el comportamiento en cada caso a una variación en la cantidad o la distribución de puntos que caracterizan la disposición. El comportamiento bicompartimental también fue observado al estudiar otras quinolonas en bovinos, como la danofloxacin (Shem-Tov y col., 1998), enrofloxacin (Varma y col., 2003) y ofloxacin (Gaur y col., 2004).

Los niveles plasmáticos observados a los 5 minutos de la inyección de 2 mg/kg de marbofloxacin por vía intravenosa (neonatas: $2,92 \pm 0,85 \mu\text{g/ml}$, 10 días: $3,39 \pm 0,97 \mu\text{g/ml}$, 50 días: $2,39 \pm 0,31 \mu\text{g/ml}$, vacas: $3,7 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$) son similares a los encontrados en otras especies como caninos (Cester y col., 1996; Schneider y col., 1996) y porcinos (Petracca y col., 1993; Marbofloxacin Reference Book, 1999), así como también en bovinos (Marbofloxacin Reference Book, 1999). Los estudios realizados en caballos (Carretero y col., 2002; Marbofloxacin Reference Book, 1999) y en pollos (Tafur Garzón, 2000) muestran, a los 5 minutos post administración, concentraciones próximas a los $10 \mu\text{g/ml}$.

Tras la administración intravenosa, la marbofloxacin presenta una rápida distribución, como muestran los valores de semivida de distribución ($t_{1/2 \alpha} = 0,21 \pm 0,15 \text{ h}$ en terneras neonatas; $0,14 \pm 0,11 \text{ h}$ en terneras de 10 días; $0,32 \pm 0,23 \text{ h}$ en animales de 50 días de vida y $0,23 \pm 0,08 \text{ h}$ en vacas). Estos valores son similares a los reportados por Shojaei Aliabadi &

Lees (2002) ($0,17 \pm 0,06$ h) en terneros. En otras especies también se describen valores aproximados; por ejemplo, Carretero y col. (2002) en caballos hallaron $t_{1/2 \alpha} = 0,15$ h y García Montijano y col. (2001) en aves rapaces reportan $t_{1/2 \alpha} = 0,13$ h. Sin embargo, presentan importantes diferencias con los registrados en perros ($t_{1/2 \alpha} = 3,4$ h) (Schneider y col., 1996) o cabras adultas ($t_{1/2 \alpha} = 1,41 \pm 0,08$ h) (Waxman y col., 2004).

En cuanto a la semivida de distribución de otras fluoroquinolonas en bovinos, se mencionan en vacas adultas valores de $0,69 \pm 0,12$ h para ciprofloxacina y $0,13 \pm 0,02$ h para enrofloxacin (Varma y col., 2003).

El volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) (modelo no compartimental) en terneras de distintas edades (neonatas: $1,11 \pm 0,19$ L/kg; 10 días: $1,11 \pm 0,32$ L/kg; 50 días: $1,18 \pm 0,12$ L/kg) podría indicar una distribución a los tejidos relativamente amplia, y es similar al reportado en otras especies como caninos (1,36 L/kg) (Schneider y col., 1996), porcinos (1,77 L/kg) (Marbofloxacin Reference Book, 1999), equinos (1,17 L/kg) (Carretero y col., 2002) y aves rapaces (1,16 L/kg) (García Montijano y col., 2000).

En el caso de las vacas, el valor hallado (V_{ss} : $0,86 \pm 0,09$ L/kg) es algo inferior al comunicado por otros autores Thomas y col. (1994a), quienes informan un V_{ss} de $1,16$ L/kg $\pm 0,23$ L/kg. No obstante, considerando los desvíos estandar de ambos trabajos puede considerarse como no significativa dicha diferencia.

En general, las fluoroquinolonas se distribuyen ampliamente en bovinos, presentando volúmenes de distribución algo más elevados que el de marbofloxacin. La danofloxacin, por ejemplo, exhibió valores de V_{ss} de 2,04 L/kg en vacas (Shem Tov y col., 1998) y de 2,48-4,3 L/kg en terneros (Giles y col., 1991b; Apley y Upson, 1991; Friis, 1993). El V_{ss} de la enrofloxacin en terneros fue de 2,3 L/kg (Kaartinen y col., 1997b) y en vacas adultas de 1,46 L/kg (Stegemann y col., 1997), mientras que norfloxacin presentó valores de 1,8 L/kg en terneros (Gips y Soback, 1996) y de 3,1 L/kg en vacas lactantes (Gips y Soback, 1999). Una posible explicación a estas diferencias podría encontrarse en el pka de estos fármacos, el cual es de 6,0-6,2 para el grupo carboxilo y 8,6-8,8 para la

amina básica, mientras que marbofloxacin tiene valores de 5,5 y 8,2, respectivamente. Esto podría significar que este último fármaco se encontraría ionizado en mayor fracción y, por tanto, tendría menor capacidad de distribución.

En nuestro estudio no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el Vss de terneras ni tampoco entre estas y vacas. Sin embargo, Waxman y col. (2004) reportan incidencia de la edad sobre este parámetro en cabras, con valores superiores en animales adultos en comparación a aquellos de 1, 3 o 6 semanas de vida, y atribuyen esta diferencia a la difusión del fármaco a los proventrículos en desarrollo. Una posible explicación a nuestros resultados podría encontrarse en un mecanismo compensatorio. En terneros jóvenes la albuminemia es menor a la de animales adultos (Knowles y col., 2000; Mohri y col., 2007), hasta aproximadamente los 60 días de vida, lo cual podría contribuir a una mayor distribución de marbofloxacin a esta edad. Paralelamente, debe considerarse por un lado que en animales jóvenes el desarrollo anatómico del sistema digestivo es incompleto hasta las 8 a 12 semanas de vida y que las fluoroquinolonas han demostrado capacidad de difundir pasivamente y acumularse en rumen (González y col., 2001). Por otro lado, las diferencias en la proporción de lípidos corporales entre animales jóvenes y adultos ha sido ampliamente demostrada (Kaartinen y col., 1997b), hallándose mayor porcentaje en los últimos. Ambos factores (desarrollo anatómico del sistema de proventrículos y mayor contenido lipídico) podrían por su parte favorecer una distribución mayor de marbofloxacin a medida que los animales maduran

El aclaramiento de marbofloxacin se ha ido incrementando con la edad de los animales (neonatos: 80,85 ml/h.kg; 10 días: 97,13 ml/h.kg; 50 días: 283,5 ml/h.kg; vacas: 285,56 ml/h.kg). Como se ha mencionado con anterioridad, la eliminación de marbofloxacin se produce por una escasa biotransformación hepática (menos del 5 % de la dosis administrada) con posterior excreción vía biliar/fecal y urinaria, siendo esta última la vía preponderante en bovinos prerrumiantes (Thomas y col., 1994a; Marbofloxacin Reference Book, 1999). Considerando lo antedicho y el hecho

de que los mecanismos de filtración glomerular y de secreción tubular activa se desarrollan en uno a tres días luego del nacimiento de terneros (De Backer, 1986), era esperable que el aclaramiento plasmático de marbofloxacin fuese más lento en terneras recién nacidas. Esta diferencia pudo observarse, cuando se compararon neonatos con animales de 50 días de vida y vacas, pero no con los de 10 días de vida. Hay, por tanto, dos grupos bien diferenciados, los de hasta 10 días de vida y los de 50 días de vida en adelante. La ausencia de diferencias entre el primer grupo se puede deber a la desviación estándar que presentan los animales neonatos y que impediría observar esas diferencias estadísticas, algo que trabajando con un número mayor de elementos, se podría subsanar, ya que se aprecia la tendencia de crecimiento del aclaramiento con la edad (80,85 vs 97,13 ml/h.kg). Por otro lado la menor acidez de la orina en los animales de 10 días (pH promedio: 6,04 para neonatas y 5,87 para terneras de 10 días) podría haber influido en los procesos de reabsorción tubular considerando que ésta es pH dependiente como se ha demostrado para la mayoría de las quinolonas (Sörgel y Kinzig, 1993) y la marbofloxacin es un ácido débil con un punto isoeléctrico de 6,85 En concordancia, Waxman y col. (2004) atribuyen las diferencias observadas en el aclaramiento de marbofloxacin en cabras, al aumento en el pH urinario en animales adultos que consumían forraje y pienso. En contraste, Kamberi y col. (1999) no encontraron diferencias en la farmacocinética de ciprofloxacina en seres humanos al modificar experimentalmente el pH de la orina. Dicho resultado fue atribuido a que la secreción tubular activa contribuye en gran manera en la excreción del antimicrobiano, y que la manipulación del pH de la orina no logra alterar la eliminación del fármaco.

La endotoxemia ha demostrado provocar acidosis metabólica y reducir el pH urinario en animales febriles, siendo también causa de un aclaramiento más lento, como se reporta en perros y cabras (Salam Abdullah, A. & Baggot, J.D., 1984), equinos (Spurlock y col., 1985) y terneros (Ismail & El-Kattann, 2007) entre otras especies.

En nuestro segundo grupo (animales 50 días de vida en adelante) La inexistencia de diferencias estadísticas entre los aclaramientos plasmáticos

(media aritmética: 283,5 ml/h.kg y 285,56 ml/h.kg, respectivamente), puede reflejar, por un lado, la madurez de los mecanismos de excreción renal de las terneras a dicha edad, y por otro la influencia de la dieta en el pH urinario. En estos grupos el consumo de dieta vegetal redundaría en la producción de orina alcalina (pH orina promedio: 7,81 y 8,43 en 50 días y vacas, respectivamente), en la cual marbofloxacin es pobremente reabsorbida debido a la ionización que experimenta. Esto explicaría también la mayor capacidad de aclaramiento en estos grupos en comparación a neonatos y 10 días.

La diferencia que se observa en el aclaramiento plasmático entre edades, redundaría en una diferencia en los valores de área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo (ABC). Los valores reportados en neonatos y 10 días ($27,63 \pm 14,23$ y $19,98 \pm 3,96$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, respectivamente), coinciden con los descritos por otros autores en terneros prerrumiantes ($15,7$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) (Marbofloxacin Reference Book, 1999) y comparables a los hallados en especies carnívoras como caninos (ABC = $20,95$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) y gatos (ABC = $16,35$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$), u omnívoras como porcinos (ABC = $11,69$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) y).

Por su parte, los datos obtenidos en animales de 50 días ($7,12$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) y adultos ($7,04$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) coinciden con los descritos en animales adultos de especies herbívoras: en cabras Waxman y col. (2004) determinaron un $\text{ABC}_{\infty} = 8,44 \pm 1,42$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, en vacas Thomas y col. (1994a) hallaron un $\text{ABC}_{\infty} = 7,73$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, y en equinos se reportó un ABC = $8,26$ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ (Marbofloxacin Reference Book, 1999).

Consecuentemente, la diferente capacidad de eliminación entre jóvenes y adultos, también se ve reflejada en el tiempo medio de residencia (MRT), observándose, en neonatos y 10 días, un MRT mucho mayor ($\text{MRT} = 11,38 \pm 2,82$ h y $9,09 \pm 1,47$ h, respectivamente) al registrado en animales de 50 días ($\text{MRT} = 3,44 \pm 0,51$ h) y adultos ($2,71 \pm 0,19$ h).

Los niveles plasmáticos de marbofloxacin en la fase de eliminación, disminuyen más rápidamente en vacas ($t_{1/2\lambda} = 2,28 \pm 0,25$ h) y terneras de

50 días de vida ($t_{1/2\lambda} = 3,21 \pm 0,57$ h) que en el resto de los grupos ($t_{1/2\lambda}$ en neonatas = $12,22 \pm 4,82$ h; $t_{1/2\lambda}$ en 10 días = $8,96 \pm 2,03$ h). La semivida terminal expresa la relación total del proceso de eliminación del fármaco durante la fase terminal, y depende no sólo del aclaramiento, sino también de la extensión de la distribución del fármaco, como se aprecia en la fórmula: ($t_{1/2} = 0.632.Vd/Cl$) (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004). Considerando esta ecuación, se puede suponer que, al no existir diferencias en el Vd entre animales de distintas edades, el menor aclaramiento es el principal responsable de la mayor semivida de eliminación en los mencionados grupos. Kaartinen y col. (1997) tampoco encontraron diferencias significativas para este parámetro al administrar enrofloxacin en terneros de un día o una semana de vida. Estos autores atribuyeron esto a que, en animales neonatos, el Vd y Cl son menores, ambos parámetros posiblemente afectados por la mayor unión del fármaco a proteínas séricas, o bien por menor proporción de tejidos lipídicos en los recién nacidos.

Si comparamos la semivida de eliminación de marbofloxacin en animales adultos, podemos concluir que, de acuerdo a nuestros resultados, es un proceso más rápido en vacas ($2,28 \pm 0,25$ h) que en cabras ($7,18 \pm 1,09$ h) (Waxman y col., 2001), ovejas ($3,96 \pm 1,54$ h) (Sidhu y col., 2010), gatos ($7,98 \pm 0,57$ h) (Albarellos y col., 2005) y perros ($10,89 \pm 0,54$ h) (Frazier y col., 2000). Cox (2007) atribuye las diferencias inter-especies observadas en la semivida de eliminación de marbofloxacin y otras fluoroquinolonas, al metabolismo particular de cada molécula, no determinando relación con el peso corporal para este parámetro, aunque si halló correlación positiva entre el aclaramiento y el volumen de distribución con la masa corporal.

V.4. FARMACOCINÉTICA DE MARBOFLOXACINA POR VÍA ORAL.

La disposición plasmática de marbofloxacin tras la administración oral se ajustó mejor a un modelo mono-compartimental con eliminación de primer orden, similarmente a lo descrito por Cester y col. (1996) en perros y Albarellos y col., (2005) en gatos. Otros autores describen el mejor ajuste a un modelo bicompartimental en perros, conejos y equinos (Schneider y col., 1996, 2000; Bousquet-Melou y col., 2002), o bien utilizaron modelos no compartimentales en perros, cerdos y equinos (Petracca y col., 1993, Carretero y col., 2002; Heinen, 2002).

La marbofloxacin se absorbió lentamente, resultando en una T_{max} de entre 6,7 y 8,4 horas. Valores aun superiores ($T_{max} = 11,3$ h) fueron reportados en otros ensayos en terneros, aunque utilizando una dosis inferior a la nuestra (1 mg/kg) (Marbofloxacin reference book, 1999). En nuestros estudios no se demostraron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro farmacocinético entre terneras de diferentes edades, ni tampoco entre terneras de 50 días tratadas con dosis diferentes de marbofloxacin (2 y 5 mg/kg p.v.).

De acuerdo a nuestros resultados, la absorción oral de este antimicrobiano fue un proceso más lento en bovinos que en gatos ($\cong 2$ h) y perros (2,13 h) (Albarellos y col., 2005; Lefebvre y col., 1998). Asimismo, para otras fluoroquinolonas como moxifloxacin y fleroxacin en equinos e ibafloxacin en perros, se determinaron T_{max} inferiores a lo hallado por nosotros, evidenciando una más rápida absorción de las fluoroquinolonas en especies monogástricas (Frazier y col.; 2000; Rebuelto y col., 2000; Coulet y col., 2002; Gardner y col., 2004).

Según Baggot (2001), considerando el desarrollo anátomo-funcional del sistema digestivo de los rumiantes, puede considerarse que hasta las 4 a 8 semanas de vida la biodisponibilidad (F%) de fármacos administrados por vía oral podría compararse a la obtenida en especies monogástricas. Por su parte Brown (1996), reporta que la biodisponibilidad oral de las

fluoroquinolonas en rumiantes es, en general, menor que en otras especies, aunque declara que el mecanismo de este fenómeno no es claro. En nuestros ensayos hemos determinado una F% de 54,0 % en neonatos, 54,8 % en terneras de 10 días, 68,6 % en animales de 50 días tratados con dosis de 2 mg/kg y 69,6 % en aquellos tratados a razón de 5 mg/kg. Estos valores están por debajo de los reportados para marbofloxacin en especies monogástricas como gatos y perros (Cester y col., 1996; Albarellos y col., 2005) en las cuales se hallaron valores cercanos al 100 %.

A través de diferentes mecanismos, la presencia de alimento en el tracto digestivo puede reducir, retrasar o favorecer la absorción de un fármaco (Coulet y col., 2002). Al respecto Bertino y col. (1994) señalan que la administración de fleroxacin con un desayuno rico en grasas en seres humanos, produce una significativa reducción en el ABC y duplicación del T_{max} . En contraste, la ingesta de comida no afectó la velocidad ni extensión de la absorción de otras quinolonas como enoxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin o trovafloxacin (Johnson y col., 1999). Otros autores afirman que la quelación de las fluoroquinolonas a cationes di o trivalentes, puede interferir con su absorción (USP - Veterinary pharmaceutical information monographs, 2003; Martínez y col., 2006). Por tanto la menor biodisponibilidad determinada en animales neonatos y de 10 días podría deberse a un fenómeno de quelación con cationes bivalentes como el calcio, presentes en la leche. Los animales de 50 días también recibían dieta láctea, sin embargo, el volumen ingerido por día por cada animal era el mismo que para las otras edades (4 L). Si consideramos que a esta edad el desarrollo de los proventrículos es significativamente diferente, la posibilidad de quelación del fármaco se vería en teoría reducida. Asimismo, estas terneras consumían una proporción mayor de forraje en forma de heno. Según Melander (1981) un tiempo de residencia prolongado debido a la presencia de alimento en el TGI podría conducir a una mejor disolución del fármaco, resultando en una mayor biodisponibilidad, y esto es lo que podría haber sucedido en terneras de 50 días de vida. Coulet y col. (2005), también demostraron que la presencia de alimento en el TGI, redundaba en mayor ABC y C_{max} de ibafloxacin en gatos.

La concentración plasmática máxima ($C_{\max} = 0.772 \mu\text{g/ml}$) y el Area Bajo la Curva ($ABC_{\infty} = 18,05 \text{ h} \cdot \mu\text{g/ml}$) resultaron significativamente mayores en animales recién nacidos en comparación a los de 10 ($C_{\max} = 0.482 \mu\text{g/ml}$; $ABC_{\infty} = 12,18 \text{ h} \cdot \mu\text{g/ml}$) y 50 días de vida (dosis de 2 mg/kg) ($C_{\max} = 0.162 \mu\text{g/ml}$ y $ABC_{\infty} = 4,88 \text{ h} \cdot \mu\text{g/ml}$). Si consideramos que las fluoroquinolonas han sido asociadas con actividad bactericida concentración-dependiente (Zhanel, 2001), en neonatos los parámetros de actividad antimicrobiana como C_{\max}/CIM y ABC/CIM serian indicativos de mayor eficacia.

Cuando se comparó la C_{\max} y ABC de animales de 50 días de vida tratados con dosis de 2 mg/kg frente a aquellos que recibieron 5 mg/kg, también fue hallada diferencia estadística (C_{\max} : $P < 0,05$; ABC_{last} : $P < 0,05$; ABC_{∞} : $P < 0,01$). Diversos autores remarcan que elevados valores de C_{\max}/CIM son necesarios para evitar la emergencia de resistencia bacteriana (Drusano y col., 1993, Madaras-Kelly y col., 1996, Walker, 2000). Dudley (1991) por ejemplo, considera que un valor de entre 8 y 10 es necesario para obtener mejores resultados clínicos. Si consideramos los valores de CIM_{90} reportados por Thomas y col. (2001) para un patógeno respiratorio de importancia clínica como *Pasteurella multocida* ($\text{CIM}_{90} = 0,039 \mu\text{g/ml}$), solamente la dosis de 5 mg/kg produciría una concentración suficiente para alcanzar el valor mencionado ($C_{\max}/\text{CIM} = 14,3$). Para *Mannheimia haemolytica* en cambio ($\text{CIM}_{90} = 0,08 \mu\text{g/ml}$; Thomas y col., 2001) con dicha dosis se alcanzarían valores de C_{\max}/CIM promedio inferiores, aunque cercanos al rango ($C_{\max}/\text{CIM} = 7,0$).

Owens & Ambrose (2002) indican que, cuando no es posible alcanzar un valor de 10 en la C_{\max}/CIM , el ABC/CIM se convierte en el mejor indicador de eficacia antimicrobiana. Estudios en modelos animales (basados en infecciones por Gram negativos), han mostrado que para este parámetro serían necesarios valores de al menos 100 para alcanzar la cura clínica. Utilizando los valores de CIM anteriormente mencionados para *P. multocida* y *M. haemolytica* (Thomas y col., 2001), podemos señalar que, en nuestros ensayos, únicamente la dosis de 5 mg/kg cumpliría con este requisito (ABC/CIM *P. multocida* = 319,0; ABC/CIM *M. haemolytica* = 155,5). No obstante, harían falta estudios clínicos que corroboren esta afirmación.

La semi vida de eliminación ($T_{1/2}$) no mostró diferencias estadísticas entre grupos, siendo un proceso lento (Neonatos = 17,46 h, 10 días = 17,68 h, 50 días 2 mg/kg = 18,46 h; 50 días 5 mg/kg = 14,48 h) en comparación a lo reportado en perros y gatos (10,89 y 7,15 h, respectivamente) (Frazier y col., 2000; Albarellos y col., 2005). Son escasos en la bibliografía consultada los reportes sobre estudios farmacocinéticos de fluoroquinolonas por vía oral en rumiantes (quizá debido a la escasa biodisponibilidad oral previamente demostrada en estas especies). Para marbofloxacin por ejemplo, solamente se reporta un estudio realizado en terneros pre-rumiantes con dosis de 1 mg/kg, en donde se informan semividas de eliminación más prolongadas (23,3 h) (Marbofloxacin reference book, 1999).

Si consideramos que la semivida de eliminación es un parámetro híbrido, dependiente de la capacidad de aclaramiento del organismo y del grado de distribución del fármaco ($T_{1/2} = 0,632 \cdot V_d / \text{Aclaramiento}$) (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004), podemos ver claramente en la figura V.1 que la inexistencia de diferencias estadísticas para este parámetro podría deberse a que, tanto el aclaramiento como el volumen de distribución se han modificado en paralelo. El Tiempo Medio de Residencia (TMR) asimismo, no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas por ser también un parámetro afectado por el aclaramiento y el volumen de distribución.

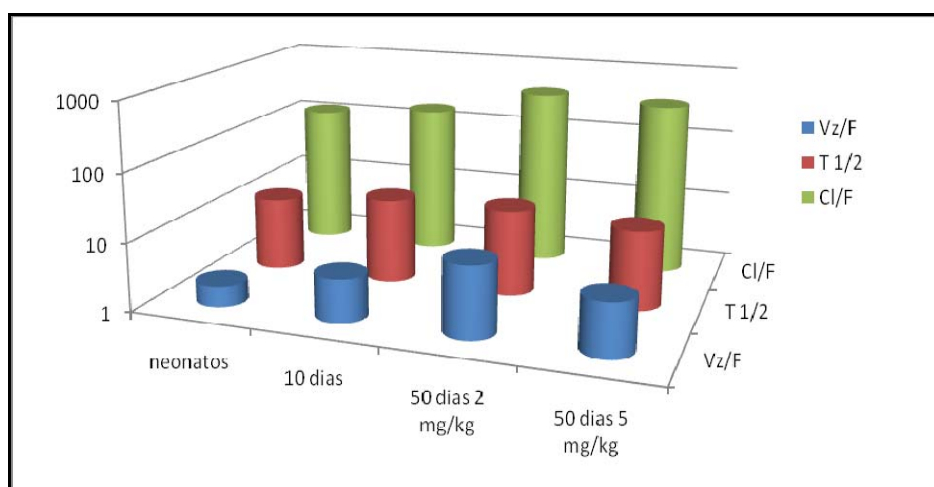


Figura V.1. Comparación entre los volúmenes de distribución (V_z/F), semividas de eliminación ($T_{1/2}$) y Aclaramientos (Cl/F) de marbofloxacin en terneras de diferentes edades tratadas por vía oral.

V.5. FARMACOCINÉTICA DE MARBOFLOXACINA POR VÍA INTRAMUSCULAR EN VACAS.

Se estudió la farmacocinética por vía intramuscular por ser una vía de administración muy empleada en rumiantes. Es la vía recomendada para la administración de marbofloxacin en vacas y terneros (junto con la vía subcutánea) y la de elección en porcinos.

Aunque se advierte que la administración intramuscular de marbofloxacin podría llegar a ser causa de reacciones locales inflamatorias de carácter transitorio en el sitio de inyección, este tipo de reacciones no se observaron tras la administración intramuscular en vacas.

Para esta vía, el modelo que mejor describió este comportamiento fue el monocompartimental abierto con eliminación de primer orden. Shojae Aliabadi & Lees (1997, 2002) y Sidhu y col. (2010), también describen la cinética de marbofloxacin en terneros mediante similar modelo, aunque reportan que algunos animales ajustaron mejor a un modelo bicompartimental.

La absorción fue un proceso rápido ($T_{1/2} K_{01} = 0,26 \pm 0,34$ h), similarmente a lo descrito por Schneider y col. (2004), quienes informan una $T_{1/2} K_{01} = 0,17 \pm 0,06$ h). La concentración plasmática máxima ($C_{max} = 1,71$ µg/ml) también fue similar a la descrita por dichos autores ($C_{max} = 1,66$ µg/ml). El alcance de concentraciones sanguíneas por encima de 1 µg/ml sería compatible con amplia actividad bactericida frente a patógenos comunes de bovinos como *Pasteurella multocida* ($CIM_{90} = 0,039$ µg/ml), *Mannheimia haemolytica* ($CIM_{90} = 0,08$ µg/ml), *Histophilus somnus* ($CIM_{90} = 0,05$ µg/ml) e incluso *Mycoplasma bovis* ($CIM_{50} = 1$ µg/ml) (Thomas y col., 2001, Thomas y col., 2003)

El tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima ($T_{max} = 0,78$ h) fue similar al informado por otros autores (0,79 h) en bovinos adultos (Marbofloxacin reference book, 1999), y porcinos (0,8 h) (Marbofloxacin Reference Book, 1999). En equinos se informó un T_{max} algo mayor (0,95 h) (Carretero y col., 2001), mientras que en ovinos y caprinos se registraron T_{max} menores que en bovinos (0,57 y 0,47 h, respectivamente) (Sidhu y

col., 2010a; Sidhu y col., 2010b).

La biodisponibilidad porcentual fue completa ($F\%=108,1\%$), tal como ha sido descrito con anterioridad para marbofloxacin en terneros prerrumiantes (102,7 %) como en animales rumiantes (112,8 %) (Thomas y col., 1994), cabras (100,74 %) (Waxman y col., 2001) y ovejas (104 %) (Sidhu y col., 2010a). Para otras fluoroquinolonas también fue demostrada excelente biodisponibilidad luego de la administración intramuscular en rumiantes. Por ejemplo, Goudah & Mouneir (2008), reportan valores de biodisponibilidad de difloxacin de 97,5 % en cabritos, mientras que Shojae Aliabadi y col. (2003) informan valores de 98,5 % para danofloxacin en ovejas respectivamente.

Los valores de Área Bajo la Curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo (ABC) para esta vía no difieren estadísticamente de los obtenidos para la vía intravenosa. Si consideramos los valores de CIM anteriormente mencionados (Thomas y col., 2001), se pueden calcular valores de ABC/CIM para *P. multocida* de 190,5, para *M. haemolytica* de 92,9 y para *H. somnus* de 148,6. Al respecto, Forrester y col. (1993) señalan que, para ciprofloxacin, la probabilidad de cura clínica y microbiológica se encuentra por encima de 80 % cuando el valor de ABC/CIM es mayor a 125. Cuando este valor es inferior, las probabilidades de cura clínica y microbiológica descienden a 42 y 26 %, respectivamente. Thomas y col. (2003), estudiaron la eficacia a campo de marbofloxacin administrada por vía intramuscular frente a la enfermedad respiratoria bovina. Estos autores concluyeron que, si bien el porcentaje de cura clínica global al cuarto día post tratamiento no difirió del obtenido con tilmicosina (84 vs 82 %, respectivamente), la eficacia de marbofloxacin en el primer día post tratamiento fue mayor que para el macrólido, con lo cual concluyen que marbofloxacin tiene un efecto curativo más rápido. Coincidentemente, Forrest y col. (1993) correlacionan el ABC/CIM con el tiempo para la erradicación de la infección (250 para una cura rápida y 125 para una cura intermedia).

Tanto el volumen de distribución ($V_z/F= 0,90 \pm 0,13$ L/kg) como el aclaramiento ($Cl/F= 263,9 \pm 39,0$ ml.kg/h) son similares a los obtenidos

para la vía intravenosa, no hallándose diferencia estadística. Valores aproximados de volúmenes de distribución fueron reportados por Schneider y col. (2004) en vacas y Sidhu y col. (2010c) en terneros. No obstante, debe recordarse que, para las vías extravasculares, el cálculo de estos dos parámetros farmacocinéticos, lleva implícita la corrección por la biodisponibilidad (F), por lo cual su importancia es relativa.

La semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) obtenida para esta vía ($2,38 \pm 0,11$ h), indica que este es un proceso rápido en vacas, siendo además, similar a la registrada para la vía intravenosa ($2,29 \pm 0,25$ h). Schneider y col. (2004), aplicando dosis múltiples de marbofloxacin en vacas, reportan valores similares ($2,53 \pm 0,28$ h). En contraste, Shojaei-Aliabadi & Lees (2002) y Sidhu y col. (2010c) hallaron valores algo superiores en terneros ($4,33 \pm 0,19$ h y $5,24 \pm 0,59$ h, respectivamente). El menor aclaramiento plasmático observado en animales jóvenes en comparación con los adultos, tanto en nuestros ensayos como por diferentes autores (Thomas y col., 1994a; Sidhu y col., 2010c) podría ser la causa de esta diferencia. En otras especies ruminantes en las cuales se estudió la cinética de marbofloxacin por vía intramuscular, se reportan semividas de eliminación de 6,77 h (cabras) y 3,65 h (ovejas) (Waxman y col., 2001; Sidhu y col., 2010a).

El Tiempo Medio de Residencia ha mostrado diferencias estadísticas con la vía intravenosa, siendo menor en esta última. Según Galinsky & Svensson (2003), el Tiempo Medio de Residencia luego de una aplicación extravascular (TMR_{EV}) es la resultante de:

$$TMR_{EV} = TMR_{IV} + TMA$$

Donde: TMR_{IV} es el tiempo medio de residencia luego de una administración instantánea (intravenosa) y TMA es el tiempo medio de absorción. Resulta lógico pensar entonces, que un mayor tiempo medio de residencia en la administración intramuscular podría deberse al proceso de absorción.

Por lo señalado, principalmente la rápida absorción, excelente biodisponibilidad y distribución, y perspectivas de eficacia clínica, puede

considerarse a la vía intramuscular como una alternativa apropiada a la intravenosa en vacas.

V.6. CINÉTICA LÁCTEA DE MARBOFLOXACINA.

Es generalmente aceptado que los xenobióticos cruzan la barrera sangre-leche en la glándula mamaria mediante difusión pasiva, y la extensión de la difusión es influenciada por las características físico-químicas de la molécula (Atkinson & Begg, 1990). Debido a la presencia de un grupo carboxílico ácido y uno amino, las fluoroquinolonas tienen propiedades anfotéricas. Sin embargo, en un pH que se encuentre entre el pKa de ambos grupos funcionales (5,5 – 8,2 para marbofloxacin) estos compuestos son lo suficientemente liposolubles como para ser capaces de difundir a tejidos (Brown, 1996). Marbofloxacin penetró extensamente en leche luego de su administración intravenosa o intramuscular. Esta observación concuerda con las investigaciones previamente realizadas con otras fluoroquinolonas en rumiantes, como enrofloxacin en vacas (Walser y col., 1993; Kaartinen y col., 1995), norfloxacin en ovejas (Soback y col, 1994) y danofloxacin en ovejas (Shem-Tov y col., 1995).

En nuestro ensayo, se estudió el perfil de excreción de marbofloxacin en leche tomando muestras de dos maneras diferentes: por ordeño manual (muestras manuales) o recogiendo una alícuota desde el lactímetro durante el ordeño mecánico de cada animal (muestras de ordeño). Si bien pudo observarse una leve diferencia entre las concentraciones de marbofloxacin determinadas en los diferentes métodos, el muestreo en ordeño (realizado cada 12 horas aproximadamente), no aporta suficiente información como para estudiar el perfil del fármaco en leche (en las vías endovenosa e intramuscular, solamente en la primera muestra se pudo cuantificar marbofloxacin). Por este motivo, se utilizarán los niveles del fármaco determinados en el muestreo manual a los fines de la discusión.

Como puede observarse en las Figuras V.2 a V.4, las concentraciones plasmáticas y lácteas de marbofloxacin mostraron un paralelismo en las

tres vías de administración utilizadas, análogamente a lo reportado por Schneider y col, (2004).

Las T_{max} determinadas tanto tras la administración por vía intravenosa ($3,33 \pm 1,03$ h) como por vía intramuscular ($3,00 \pm 2,00$ h) indican un cierto retraso en la aparición de marbofloxacin en leche. Estos valores, no obstante, son dependientes de los intervalos de muestreo seleccionados, debiendo por tanto, tomarse con cierta cautela. Schneider y col. (2004) reportan una T_{max} sérica de 0,72 h, mientras que la T_{max} láctea fue de 2,50 h cuando el fármaco fue administrado por vía intramuscular en vacas. Puede considerarse a la leche como un compartimento farmacocinético periférico, particularmente cuando una cantidad considerable de fármaco puede encontrarse en ella luego de una administración parenteral (Atkinson y Begg, 1990). Resulta lógico interpretar entonces, que este retardo aparente en la llegada de marbofloxacin a leche se debe al tiempo durante el cual las moléculas son distribuidas desde el compartimento central a este periférico.

La relación ABC_{leche}/ABC_{plasma} indicó que la fracción de fármaco excretado en leche fue mayor en la vía intramuscular ($ABC_{leche}/ABC_{plasma} = 0,64$) que en la intravenosa ($ABC_{leche}/ABC_{plasma} = 0,54$). Así mismo, Shem-Tov y col. (1997) reportan valores de 1,44 y 0,72 para marbofloxacin administrada por vía intravenosa e intramuscular, respectivamente. Sin embargo, estos autores tomaron muestras de plasma solamente hasta las 12 h post administración, truncando los valores de ABC, mientras que el muestreo de leche continuó hasta las 24 h luego del tratamiento. De esta manera, se pudo haber subestimado en dicho trabajo el ABC de marbofloxacin en plasma. Valores superiores e indicativos de excreción láctea más significativa han sido determinados para danofloxacin en vacas ($ABC_{leche}/ABC_{plasma} = 6,16$ y $3,52$ en vía IV e IM, respectivamente) y enrofloxacin en ovejas ($ABC_{leche}/ABC_{plasma} = 5,62$ y $8,15$ en vía IV e IM, respectivamente) (Shem-Tov y col, 1998; Haritova y col., 2003).

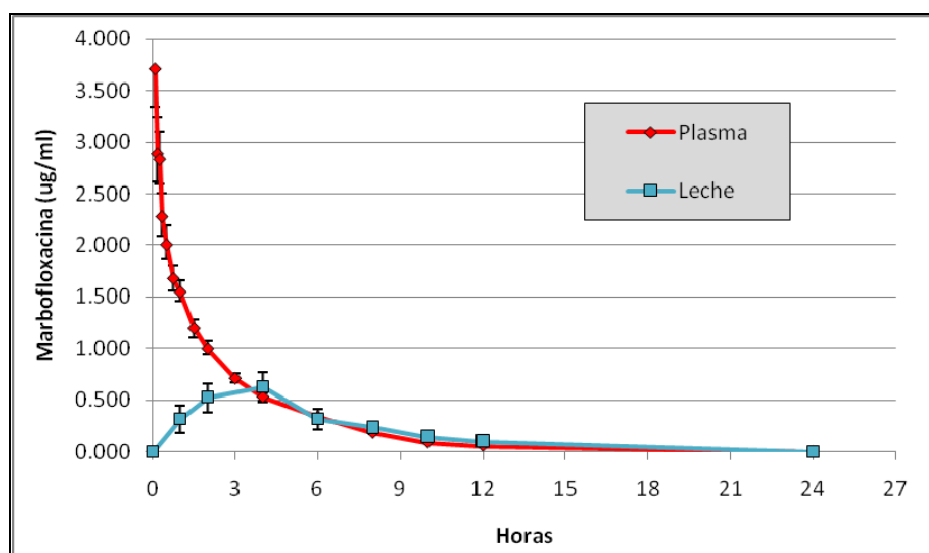


Figura V.2. Comparación entre el perfil plasmático y lácteo de marbofloxacin (se muestran los valores del muestreo manual de leche) luego de su administración por vía intravenosa.

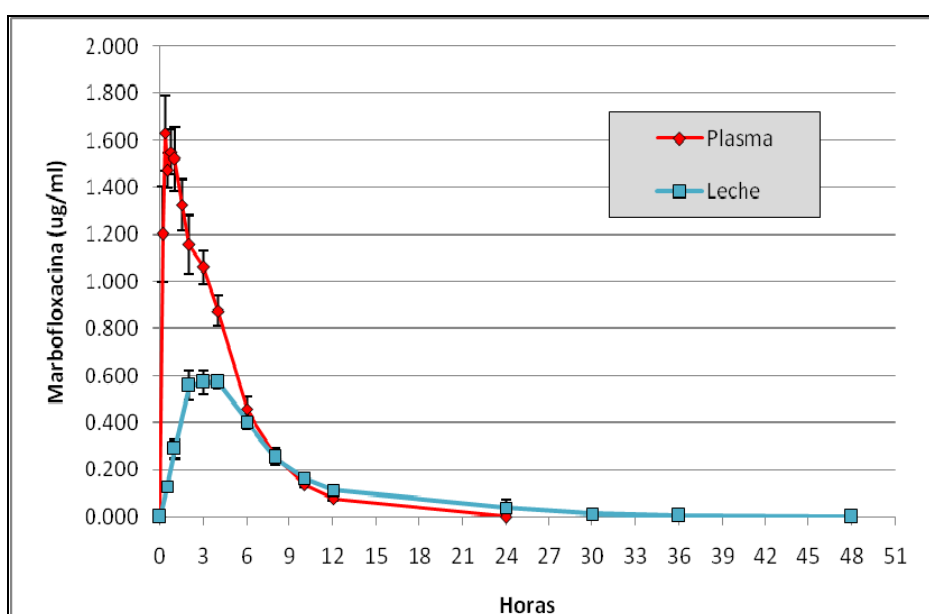


Figura V.3. Comparación entre el perfil plasmático y lácteo de marbofloxacin (se muestran los valores del muestreo manual de leche) luego de su administración por vía intramuscular.

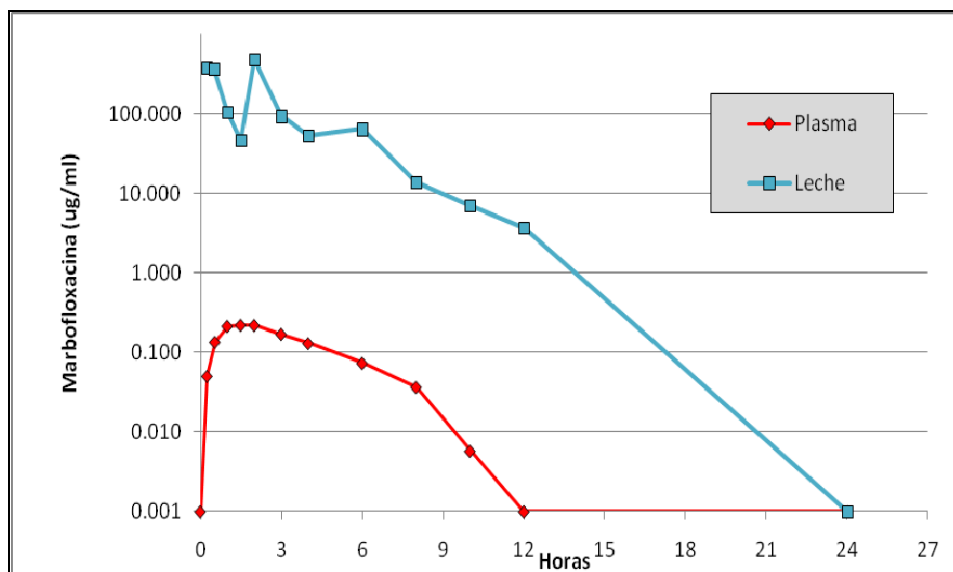


Figura V.4. Comparación entre el perfil plasmático y lácteo de marbofloxacin (se muestran los valores del muestreo manual de leche) luego de su administración por vía intramamaria.

Al comparar la semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) en leche y plasma se pudo observar que fue más prolongada en la primera, tanto para la vía intravenosa ($T_{1/2\lambda_{leche}}/T_{1/2\lambda_{plasma}}=1,31$) como intramuscular ($T_{1/2\lambda_{leche}}/T_{1/2\lambda_{plasma}}=2,33$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Petracca y col. (1993) en cerdas lactantes y Shem-Tov y col. (1997a) en vacas y ovejas, quienes, incluso, indican una tendencia de marbofloxacin a acumularse en leche. Sin embargo en nuestros ensayos, y de acuerdo a la relación ABC_{leche}/ABC_{plasma} anteriormente citada, no se ha producido acumulación de marbofloxacin en leche. Schneider y col. (2004) tampoco reportan acumulación de marbofloxacin en leche de vacas, indicando además, que los metabolitos N-desmetil-marbofloxacin y N-óxido-marbofloxacin no podrían contribuir a dicho fenómeno, considerando que no se encontraron niveles cuantificables de los mismos en la secreción.

Una semivida de eliminación láctea más prolongada en la vía intramuscular ha sido reportada también para danofloxacin en bovinos (Shem-Tov y col. 1997a, 1998) y enrofloxacin en ovejas (Haritova y col., 2003).

Para que un fármaco antimicrobiano sea efectivo, se deben alcanzar concentraciones terapéuticas en la biofase o sitio de infección. Los patógenos mamarios pueden estar libres en la leche (*E. coli*), unidos a la

superficie de membranas biológicas (*Streptococcus* spp.) o incluso vivir en el compartimento intracelular (*Staphylococcus* spp. en polimorfonucleares neutrófilos). Para alcanzar la biofase, el tratamiento puede ser administrado tanto por vía intramamaria, como parenteral. La administración intramamaria de fármacos ofrece una opción conveniente para el tratamiento de mastitis en animales lecheros. Las ventajas potenciales de esta ruta incluyen el alcance de elevadas concentraciones del fármaco en el sitio de infección sin absorción sistémica importante, previniendo por tanto los efectos colaterales indeseados o la producción de residuos tisulares (Gruet y col., 2001).

No se han encontrado reportes en la bibliografía acerca del uso intramamario de fluoroquinolonas, no obstante varios gérmenes comúnmente sensibles, como *E. coli*, *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp., suelen estar involucrados como agentes etiológicos de esta patología. Adicionalmente, según Gruet y col. (2001) la difusión intramamaria de las quinolonas es buena, tanto cuando se administran por vía parenteral como local (Gruet y col., 2001). No obstante, será necesaria la realización de estudios clínicos para la confirmación de la eficacia de este grupo de antimicrobianos.

Como era esperable, tanto la C_{max} ($479,28 \pm 105,45 \mu\text{g/ml}$) como el ABC ($1383,0 \pm 328,5 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/ml}$) fueron significativamente superiores en la administración intramamaria de marbofloxacin en comparación a las vías IV e IM. Se observó un pico secundario del fármaco a las 2 h post administración (excepto en una vaca en la cual se produjo a las 6 h post administración), cuya media aritmética fue de $344,30 \mu\text{g/ml}$. El reingreso del fármaco desde sangre a leche podría haber contribuido, al menos en parte a la aparición de dicho pico en leche, considerando que, tanto en leche ($\text{pH} = 6,4 - 7,0$) como plasma ($\text{pH} = 7,30 - 7,45$), marbofloxacin se conserva en buena proporción no ionizada, unida escasamente a proteínas y manteniendo entonces elevada liposolubilidad (Gehring & Smith, 2006).

Factores farmacotécnicos también pudieron favorecer la aparición de un pico secundario. La disolución de un producto que ha sido infundido en la glándula mamaria puede ser directa (en el caso de las formas líquidas) o envolver la desintegración de la forma farmacéutica (en el caso de los

preparados sólidos) y la posterior liberación del principio activo. Una vez liberado del excipiente, el ingrediente activo es libre para dispersarse a través del volumen de leche en la cisterna de la glándula y el sistema de túbulos de la misma (Ziv, 1980). En la glándula mamaria en lactancia, la proporción y rapidez del proceso de disolución determina la fracción de la dosis administrada que estará disponible para su dispersión por la glándula. En nuestros ensayos no fueron realizadas pruebas de disolución *in vitro* del preparado farmacológico, siendo por tanto difícil inferir si la liberación de marbofloxacin tuvo un comportamiento bifásico, el cual explicaría la aparición de un segundo pico en leche.

La semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda} = 1,31 \pm 0,51$ h) y tiempo medio de residencia ($TMR = 3,05 \pm 0,87$ h) en leche luego de la aplicación intramamaria de marbofloxacin indicarían que la depleción del fármaco es un proceso rápido. La factibilidad de utilización de preparados intramamarios a base de marbofloxacin deberá contemplar, además de la mencionada eficacia clínica, estudios de residuos adecuados a las normativas vigentes, a través de los cuales se podrá definir más acertadamente el perfil de excreción en leche.

V.7. DETERMINACIÓN DE CIM de *Staphylococcus aureus* y PARÁMETROS INDICADORES DE EFICACIA ANTIMICROBIANA.

Staphylococcus aureus es una causa común de infección en la glándula mamaria del bovino (Phuektes y col., 2001), ovino (Pengov, 2001) e incluso humana (Estamon & Adlam, 1983).

En el control de la mastitis producida por *Staphylococcus* spp., la terapia antibiótica tiene un rol importante, sin embargo, el éxito en el tratamiento, particularmente durante la lactancia es aun hoy generalmente escaso (Pengov y col., 2001). La resistencia de las cepas bacterianas a los antimicrobianos utilizados en productos de uso intramamario puede ser una de las importantes razones para este fallo terapéutico (Pengov & Ceru, 2003).

La determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) provee información sobre la concentración actual indicativa de potencia antibiótica frente a una especie bacteriana particular. Diversos autores reportan CIM₉₀ de marbofloxacin frente a *S. aureus*. Por ejemplo Shem-Tov y col. (1997) indican valores de 0,3 µg/ml, Schneider y col. (2004) de 0,229 µg/ml, Gánier y col. (2004) de 0,25 – 0,5 µg/ml, y Meunier y col. (2004) reportan que, entre 1994 y 2001, la CIM₉₀ de este patógeno osciló entre 0,12 y 1 µg/ml. Se debe recalcar, sin embargo, que para la clínica veterinaria práctica, datos de susceptibilidad recientes para los patógenos comunes, reportados a nivel regional, son de gran valor en la selección de agentes antimicrobianos específicos (Pengov & Ceru, 2003). De esta manera los datos aportados por el presente estudio pueden considerarse de relevancia.

Si bien la CIM₉₀ determinada en nuestros ensayos (1 µg/ml) es mayor a la reportada por los trabajos anteriormente mencionados, de acuerdo a los puntos de corte proporcionados por el laboratorio elaborador del producto comercial (Vetoquinol®, Lure, Francia), puede considerarse a todas las cepas testeadas como sensibles a marbofloxacin. Al cotejar los resultados de la determinación de CIM con discos de antibiograma conteniendo 5 µg de marbofloxacin, todas las cepas tuvieron un halo de inhibición superior a 18 mm, umbral que indica la sensibilidad de las mismas.

Diversos autores reportaron muy buena actividad *in vitro* de distintas fluoroquinolonas frente a *S. aureus* aislados de mastitis en bovinos. Cruz y col. (1998) indican para danofloxacin valores de CIM₉₀=0,18 µg/ml, De Oliveira y col. (2000) reportan para enrofloxacin niveles de CIM₉₀=0,06 a 0,31 µg/ml, y para ciprofloxacin se menciona un rango de CIM₉₀=0,12 a 0,5 µg/ml (DANMAP, 2000-2001). No se ha demostrado, por el contrario, sensibilidad de este microorganismo a la norfloxacin, de acuerdo a lo informado por Schlegelva y col. (2002), quienes indican CIM₉₀=2 µg/ml.

La relación entre la farmacocinética y actividad antimicrobiana (farmacodinamia) de las fluoroquinolonas, puede ser utilizada para determinar la dosis a administrar a los fines de un exitoso resultado clínico. Desde una perspectiva de relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD), las fluoroquinolonas han sido asociadas con actividad

concentración-dependiente (Zhanel, 2001).

Los parámetros indicadores de eficacia relacionados con dicha actividad incluyen la relación de área bajo la curva de concentración (ABC) frente a la CIM calculada para el patógeno aislado (o bien, si dicho valor no se conoce, se puede utilizar la CIM de patógenos de la misma especie que la aislada), conocida como ABC/CIM, y la relación de concentración máxima (C_{\max}) dividida por la CIM, o C_{\max}/CIM . Ambos parámetros están estrechamente relacionados, y son importantes para asegurar eficacia antimicrobiana (Martínez y col., 2006).

Para antimicrobianos con actividad concentración-dependiente, es necesario alcanzar adecuados niveles en el sitio de infección, los cuales deben destruir la población bacteriana existente o, al menos, reducir significativamente el número de microorganismos, de tal manera que los mecanismos de defensa del hospedador puedan encargarse de controlar o eliminar los patógenos remanentes (Martínez y col., 2006).

Para considerar a la C_{\max}/CIM como una buena herramienta predictiva de cura clínica y evitar la emergencia de resistencia bacteriana, se deberían alcanzar valores de al menos 10 (Pickerill y col., 2000; Schentag y col., 2001). Drusano y col. (1993) incluso indican que cuando existe una alta carga bacteriana en la biofase, el riesgo de que ocurran eventos mutacionales es mayor, debido simplemente a las leyes de la probabilidad. En estos casos, para asegurar máxima actividad bactericida, el objetivo sería alcanzar C_{\max}/CIM de 10 a 12.

En el caso de la ABC/CIM, se recomienda un mínimo de 125 h para pronosticar cura clínica, mientras que un valor superior a 250 h podría indicar incluso la erradicación del patógeno (Pickerill y col., 2000; Schentag y col., 2001; Schneider y col., 2004). Algunos autores señalan además, que estos índices son inferiores cuando se trata de microorganismos gram-positivos, siendo aproximadamente de 30 a 50 y que, para fluoroquinolonas de tercera y cuarta generación el ABC/CIM necesario es substancialmente menor cuando la C_{\max}/CIM es ≥ 10 (Wright y col., 2000; Nightingale y col., 2000).

En nuestros ensayos, únicamente la vía intramamaria alcanzó los valores mencionados, tanto para C_{\max}/CIM (479,28) como para ABC/CIM (1383,0 h). El perfil de excreción lácteo obtenido luego de las administraciones intravenosa e intramuscular en dosis únicas falló en lograr concentraciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. Similares apreciaciones fueron mencionadas por Schneider y col. (2004) y Kietzmann y col. (2008), pero por otro lado Shem-Tov y col. (1997) sugirieron que la administración intramuscular de marbofloxacin en dosis de 4 mg/kg cada 12 h sería apropiada para la realización de ensayos de eficacia frente a infecciones mamarias por gérmenes gram-positivos.

Por otra parte, la eficacia de marbofloxacin frente a infecciones mamarias producidas por gérmenes gran-negativos como *Escherichia coli* ha sido ampliamente demostrada, siendo las bajas CIM (0,008 a 0,06 $\mu\text{g/ml}$) uno de los principales factores que propician dicha efectividad (Meunier y col., 2004).

Diversos autores determinaron que la actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas puede verse reducida en presencia de cationes bivalentes como calcio y magnesio. Considerando que las concentraciones de estos iones son elevadas en leche (1,25 y 0,12 g/L, respectivamente), Gániere y col. (2004) estudiaron el efecto del medio de cultivo (caldo Mueller Hinton o leche semidescremada), sobre los valores de CIM y CMB (concentración bactericida mínima) de diversos antimicrobianos frente a patógenos mamarios de bovinos. En el caso de marbofloxacin, hubo un incremento de entre 2 a 4 veces en los valores de estas concentraciones cuando se midieron en leche. Concretamente para *S. aureus*, la CIM determinada en agar se incrementó al doble cuando se testeó en leche. Similares hallazgos fueron reportados por Fang & Pyorala (1996), quienes demostraron que la leche reduce aproximadamente a la mitad la actividad bactericida de enrofloxacin frente a *E. coli*. Teniendo en cuenta esta información, es lógico suponer que los valores de concentración inhibitoria mínima determinados en nuestro trabajo deberían, al menos, duplicarse para calcular los predictores de eficacia antimicrobiana. Con todo, los puntos de corte que determinaríamos con una CIM_{90} de 2 $\mu\text{g/ml}$ seguirían siendo

prometedores para la vía intramamaria ($C_{\max}/CIM=239,64$; $ABC/CIM=691,5$ h).

La relación PK/PD puede servir como una guía para obtener estimaciones iniciales de las dosis que serán necesarias para lograr una terapia antimicrobiana exitosa. Sin embargo, la utilización de estos parámetros para pronosticar eficacia clínica debe ser cuidadosa. Los valores de CIM no proveen información del tiempo necesario para matar los microorganismos, el tiempo necesario para alcanzar la máxima actividad bactericida o la reducción máxima del conteo de bacterias viables (MacGowan & Bowker, 2002). Además, las concentraciones determinadas en sangre o leche no reflejan necesariamente la habilidad del compuesto para penetrar en el sitio de infección y/o de la bacteria (Martínez y col., 2006), y ha sido demostrado que elevadas concentraciones de algunas fluoroquinolonas pueden producir menor actividad bactericida, debido a inhibición de la síntesis de ARN y proteínas (Lode y col., 1998). En último lugar, es la integridad del sistema inmunológico del hospedador, la que determinará la efectividad de esta relación farmacocinética-farmacodinamia (Toutain y col., 2002).

Por todo lo mencionado, y como fue mencionado con anterioridad, sería recomendable complementar los datos aquí presentados con la realización de estudios de eficacia clínica de marbofloxacin frente a infecciones mamarias producidas por cepas locales de *S. aureus*.

VI – CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La cinética de marbofloxacinina administrada por vía intravenosa en terneras y vacas se ajustó a un modelo bicompartimental abierto con eliminación de primer orden, con un amplio volumen de distribución, confirmando estudios previos.
2. La disposición plasmática de la marbofloxacinina en bovinos se ve influenciada por la edad. Los animales menores de 10 días tienen una menor capacidad de aclaramiento plasmático, que aumenta con la edad y consecuentemente presentan una mayor Área Bajo la Curva (ABC) y un Tiempo Medio de Permanencia (MRT) y una Semivida de Eliminación ($t_{1/2\lambda}$) más prolongados
3. La disposición cinética de marbofloxacinina administrada por vía oral en terneras se ajustó a un modelo monocompartimental abierto con eliminación de primer orden. La biodisponibilidad por esta vía en las diferentes edades oscila entre un 54% para menores de 10 días y 68-69% para los de 50 días (2 y 5 mg/kg, respectivamente), valor inferior al que se presenta en especies no rumiantes; pudiendo atribuirse este hecho a la ingesta de leche o derivados lácteos por la quelación con el calcio presente en este alimento, lo que a su vez también justificaría la mayor biodisponibilidad en terneras de 50 días a pesar del mayor desarrollo del complejo rumino reticular.
4. En sentido contrario los animales menores de 10 días presentan mayores C_{max} y ABC que los de 50 días que podría estar relacionado con un mayor tiempo de absorción/distribución ($T_{max50d} > T_{max10d} > T_{max2d}$) y por tanto con unos sistemas de eliminación mas eficaces.
5. Teniendo en cuenta los valores obtenidos de C_{max} y ABC en terneras de diferentes edades y considerando que la marbofloxacinina es un antimicrobiano concentración-dependiente,

a las dosis estudiadas tanto por vía intravenosa como oral, los índices de eficacia PK/PD (C_{max}/CIM y AUC/CIM), son más favorables para los animales menores de 10 días, si bien la alta quelación con cationes que se produce por vía oral, puede reducir notablemente la utilización clínica eficaz de la misma

6. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración IM en vacas no presentan diferencias estadísticamente significativas con la vía EV, su biodisponibilidad es completa (108%) y el tiempo de permanencia (MRT) es mas prolongado, lo que permitiría regímenes posológicos más amplios.
7. Tras la administración EV e IM de marbofloxacin, se alcanzaron elevadas concentraciones en leche con un coeficiente de reparto basado en las ABC_{leche}/ABC_{plasma} de 0,54 para la EV y de 0,64 para la IM, cuando se utilizó el sistema de ordeño que denominamos manual, ya que con el denominado mecánico (cada 12h), no se obtuvieron concentraciones suficientes para el análisis cinético de la marbofloxacin en leche.
8. La aplicación intramamaria de marbofloxacin con la formulación farmacéutica utilizada en este estudio, no produjo efectos adversos observables en los animales, y permitió alcanzar elevadas Área Bajo la Curva y Concentraciones máximas en leche, así como concentraciones mensurables en plasma durante 10 h. Podemos destacar la presencia de un segundo pico de concentración de marbofloxacin, aproximadamente a las 2 horas de su administración IMam, que podría deberse al reingreso desde el plasma ya que coincide con la presencia en ese tiempo de un plateau de concentraciones en sangre.
9. Basándonos en las concentraciones inhibitorias mínimas determinadas para cepas locales de *Staphylococcus aureus*, en leche, los índices de eficacia antimicrobiana PK/PD (C_{max}/CIM ,

ABC/CIM), indican que, solo la vía IMam podría ser efectiva en el tratamiento de mastitis bovina producida por este microorganismo.

VII – RESUMENES

VII-1. RESUMEN EN ESPAÑOL.

Las marbofloxacin es un antimicrobiano de uso veterinario perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas. Está indicado para bovinos, porcinos, caninos y felinos. Las características farmacocinéticas que presenta en diversas especies permiten la administración por distintas vías con una buena biodisponibilidad, una amplia distribución tisular y una prolongada permanencia en el organismo.

El objetivo de este trabajo fue definir la influencia de la edad en el comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en bovinos, su perfil de eliminación en leche tras administración por vías IV, IM e IMM y la determinación de parámetros PK/PD frente a cepas locales de *S. aureus* aisladas de cuartos mamarios con mastitis. Para ello, se estudió la cinética en terneras neonatas, de 10 y 50 días de vida y en vacas, utilizando en las terneras la vía intravenosa (2 mg/kg) y oral (2 mg/kg en terneras neonatas y de 10 días, 2 y 5 mg/kg en terneras de 50 días de vida). En vacas se administró el fármaco por vía intravenosa (2 mg/kg), intramuscular (2 mg/kg) e intramamaria (100 mg/cuarterón). Paralelamente, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de marbofloxacin frente a cepas locales de *S. aureus*. Con los datos de concentraciones en leche de marbofloxacin tras su administración por las diferentes vías, se calcularon predictores de eficacia PK/PD.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin tras la **administración intravenosa en terneras y vacas** mostró un perfil bifásico, siendo el modelo bicompartimental abierto con eliminación de primer orden el que mejor describió este comportamiento. No se hallaron diferencias estadísticas significativas en el Vss entre las terneras de distintas edades, ni con las vacas. El aclaramiento de marbofloxacin se ha ido incrementando con la edad de los animales; no hubo diferencias entre animales de 50 días de vida y vacas. La diferencia que se observa en el aclaramiento plasmático entre edades, se acompaña de una diferencia en los valores de área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo (ABC). En neonatos y 10 días se observó además un MRT mucho mayor ($MRT = 11,38 \pm 2,82$ h y $9,09 \pm 1,47$ h, respectivamente) al registrado en animales de 50 días ($MRT = 3,44 \pm 0,51$ h) y adultos ($2,71 \pm 0,19$ h). Lo mismo sucede con los valores de semivida de eliminación en neonatos y 10 días frente a vacas ($t_{1/2\lambda} = 2,28 \pm 0,25$ h) y terneras de 50 días de vida ($t_{1/2\lambda} = 3,21 \pm 0,57$ h) que en el resto de los grupos

La disposición plasmática de marbofloxacin tras la **administración oral en terneras** se ajusta a modelo mono-compartimental con eliminación de primer orden. La marbofloxacin se absorbió lentamente, resultando en una T_{max} de entre 6,7 y 8,4 horas. La concentración plasmática máxima (C_{max}) y el Área Bajo la Curva (ABC) resultaron significativamente mayores en animales recién nacidos en comparación a los de 10 y 50 días (dosis de 2 mg/kg). La semi vida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) no mostró diferencias estadísticas entre grupos, siendo un proceso lento (Neonatos = 17,46h, 10 días = 17,68 h, 50 días 2 mg/kg = 18,46 h; 50 días 5 mg/kg = 14,48 h).

Luego de la **administración intramuscular en vacas**, el modelo monocompartimental abierto con eliminación de primer orden fue el que mejor describió la cinética. La absorción fue un proceso rápido ($T_{1/2 K01}=0,26 \pm 0,34$ h; $T_{max} = 0,78$ h). La biodisponibilidad porcentual fue completa ($F\%=108,1\%$), y los valores de Área Bajo la Curva para esta vía no difirieron estadísticamente de los obtenidos para la vía intravenosa.

Al comparar **perfil lácteo** con las concentraciones plasmáticas de marbofloxacin, se pudo observar un paralelismo entre ambas para las tres vías de administración utilizadas. Las T_{max} determinadas tanto en la vía intravenosa ($3,33 \pm 1,03$ h) como intramuscular ($3,00 \pm 2,00$ h) indican un cierto retraso en la aparición de marbofloxacin en leche. La relación ABC_{leche}/ABC_{plasma} indicó que la fracción de fármaco excretado por leche fue mayor en la vía intramuscular ($ABC_{leche}/ABC_{plasma} = 0,64$) que en la intravenosa ($ABC_{leche}/ABC_{plasma} = 0,54$). Al comparar la semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) en leche y plasma se pudo observar que fue más prolongada en la secreción láctea, tanto en la vía intravenosa ($T_{1/2\lambda_{leche}}/T_{1/2\lambda_{plasma}}=1,31$) como intramuscular ($T_{1/2\lambda_{leche}}/T_{1/2\lambda_{plasma}}=2,33$), aunque sin producir acumulación de marbofloxacin en leche.

Tanto la C_{max} ($479,28 \pm 105,45$ µg/ml) como el ABC ($1383,0 \pm 328,5$ µg.h/ml) fueron significativamente superiores en la administración intramamaria de marbofloxacin en comparación a las vías IV e IM. Se observó un pico secundario del fármaco aproximadamente a las 2 h post administración), cuya media aritmética fue de 344,30 µg/ml. La semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda} = 1,31 \pm 0,51$ h) y tiempo medio de residencia (TMR = $3,05 \pm 0,87$ h) en leche luego de la aplicación intramamaria de marbofloxacin indicarían que la depleción del fármaco es un proceso rápido, aunque posteriores ensayos deberían realizarse para confirmar esta afirmación.

La **CIM₉₀** determinada para las 163 cepas de *S. aureus* testeadas fue de 1 µg/ml. De acuerdo a los puntos de corte utilizados, puede considerarse a todas las cepas testeadas como sensibles a marbofloxacin. En nuestros ensayos, únicamente la vía intramamaria alcanzó los valores apropiados de eficacia antimicrobiana, tanto para C_{max}/CIM (479,28) como para ABC/CIM (1383,0 h).

VII-2. SUMMARY.

Marbofloxacin is an antimicrobial for veterinary use belonging to the fluoroquinolone family. It is indicated for cattle, swine, dogs and cats. Its pharmacokinetic properties as good bioavailability, a wide tissue distribution and a prolonged permanence in the organism in many animal species allow its administration by different routes..

The aim of this work was to define the influence of age on the pharmacokinetics of marbofloxacin in cattle and the determination of PK/PD parameters against local strains of *S. aureus* isolated from mastitis-affected mammary glands. In order to achieve this goal, the pharmacokinetic behaviour was studied in female calves at birth, 10 and 50 days of life and in adult cows, administering the drug in the calves by the intravenous (2 mg/kg) and oral routes (2 mg/kg in newborn calves and 10 days old calves, 2 and 5 mg/kg in 50 days old calves). In cows, the drug was administered by the intravenous (2 mg/kg), intramuscular (2 mg/kg) and intramammary (100 mg/quarter) routes. Simultaneously, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of marbofloxacin against 163 local *S. aureus* strains were determined. PK/PD parameters were calculated with marbofloxacin milk depletion data.

After **intravenous administration to calves and cows**, the model that best described the behavior of marbofloxacin was the bicompartimental open model with first order elimination. There were no statistical differences in the Vss nor between calves of different age, neither with the cows. Clearance values increased with the animal's age, although there were not differences between 50 days old calves and cows. The observed difference between ages in plasma clearance is accompanied by differences on the area under the curve (AUC). In neonates and 10 days old calves higher values of MRT (MRT = $11,38 \pm 2,82$ h and $9,09 \pm 1,47$ h, respectively) were observed in comparison to 50 days old animals (MRT = $3,44 \pm 0,51$ h) and adult cows ($2,71 \pm 0,19$ h). Plasma levels of marbofloxacin in the elimination phase, diminished more rapidly in cows ($t_{1/2\lambda} = 2,28 \pm 0,25$ h) and 50 days old calves ($t_{1/2\lambda} = 3,21 \pm 0,57$ h) than in the rest of the groups (PONEER ACÁ LOS VALORES).

Marbofloxacin plasma disposition after **oral administration to calves** was best described by a mono-compartmental open model with first order absorption. The drug was slowly absorbed, resulting in a T_{max} between 6,7 and 8,4 hours. Maximum

plasmatic concentration (C_{max}) and Area Under the Curve (ABC) showed statistically higher values in newborn than 10 and 50 (dose 2 mg/kg) days old calves. Elimination half-life ($t_{1/2\lambda}$) did not show statistical differences between groups, being a slow process (Arithmetical mean: Neonates = 17,46 h, 10 days old = 17,68 h, 50 days old 2 mg/kg = 18,46 h; 50 days old 5 mg/kg = 14,48 h).

After **intramuscular administration in cows**, a monocompartmental open model with first order elimination was the one that best described marbofloxacin kinetics. Absorption was a fast process ($T_{1/2 K01}=0,26 \pm 0,34$ h; $T_{max} = 0,78$ h). Bioavailability was complete ($F\%=108,1$ %), and ABC values for this route did not differ statistically from those obtained by the intravenous administration. Volume of distribution ($V_z/F=0,90 \pm 0,13$ L/kg), clearance ($Cl/F=263,9 \pm 39,0$ ml.kg/h) and elimination half-life ($t_{1/2\lambda} = 2,38 \pm 0,11$ h) were similar to the obtained for the intravenous route, whereas mean residence time ($TMR=6,45 \pm 1,82$ h) was higher after intramuscular administration.

A parallelism between **marbofloxacin milk profile** and plasmatic concentrations, could be observed for all the three routes of administration. T_{max} after the intravenous ($3,33 \pm 1,03$ h) and intramuscular ($3,00 \pm 2,00$ h) routes, indicate a true delay in marbofloxacin milk-excretion. The ratio ABC_{milk}/ABC_{plasma} indicated that the fraction of drug excreted in milk was higher for the intramuscular ($ABC_{milk}/ABC_{plasma}=0,64$) than for the intravenous administration ($ABC_{milk}/ABC_{plasma} = 0,54$). When comparing elimination half-life in milk and plasma, a longer value for the former could be observed, for both the intravenous ($t_{1/2\lambda_{milk}}/t_{1/2\lambda_{plasma}}=1,31$ h) and intramuscular routes ($t_{1/2\lambda_{milk}}/t_{1/2\lambda_{plasma}}=2,33$ h), although marbofloxacin accumulation in milk did not occur.

C_{max} ($479,28 \pm 105,45$ µg/ml) and ABC ($1383,0 \pm 328,5$ hr* g/ml) were significantly greater for intramammary administration, in comparison to intravenous and intramuscular treatments. A marbofloxacin secondary peak, (around 2 h post administration) was observed, with an arithmetic mean of 344,30 µg/ml. Elimination half-life ($T_{1/2\lambda} = 1,31 \pm 0,51$ h) and mean residence time ($TMR = 3,05 \pm 0,87$ h) in milk after intramammary administration indicate that the depletion would be a rapid process. Further studies will be necessary to confirm this.

Minimum inhibitory concentrations (CIM₉₀) determined for the 163 local *S. aureus* strains tested was 1 µg/ml. With the cut-off points used, it can be considered that all of the strains assayed were marbofloxacin-sensible. In our job, only the intramammary route achieved appropriate **PK/PD values**, taking into account the C_{max}/CIM (479,28) and ABC/CIM (1383,0 h) obtained.

VIII – **BIBLIOGRAFÍA**

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, A.R., Aramayona, J.J., Muñoz, M.J., Pla Delfina, J.M., Saez, M.P. & Bregante, M.A. (1994) Disposition of ciprofloxacin following intravenous administration in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **17**, 384-388.
- Abd El Aziz, M.I., Aziz, M.A., Soliman, F.A. & Afifi, N.A. (1997) Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chickens. *British Poultry Science*, **38**, 164-168.
- Abo-El-Sooud, K. and Goudah, A. (2009) Pharmacokinetics and intramuscular bioavailability of difloxacin in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinary Journal*, 179, (2)282-286.
- Albarellos, G., Rebuelto, M., Otero, P., Gentilini, E. & Hallu, R. (1996) Pharmacokinetics of norfloxacin in healthy dogs after single oral dose. *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires*, **77**, 26-32.
- Albarellos, G.; Montoya, L. & Landoni, M.F. (2005) Pharmacokinetics of marbofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *The Veterinary Journal*. 170: 222-229.
- Ali, B.H. (1997) The hepatic and duodenal activities of some drug metabolizing enzymes in chickens: influence of infection with *Escherichia coli* endotoxin and coccidiosis. *European J. Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **22**, 223-227.
- Aminimanizani, A.; Beringer, P. & Jelliffe, R. (2001) Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials. *Clinical Pharmacokinetics*. 40:169-187.
- Anadón, A., Martínez Larrañaga, M.R., Velez, C., Díaz, M.J. & Bringas, P. (1992) Pharmacokinetics of norfloxacin and its N-desmethyl and oxo- metabolites in broiler chickens. *American Journal of Veterinary Research*, **53**, 2084-2089.
- Anadón, A., Martínez Larrañaga, M.R., Díaz, M.J., Fernández, R., Martínez, M.A. & Fernández, M.C. (1995). Pharmacokinetics and tissue residues of norfloxacin and its N-desmethyl and oxo- metabolites in healthy pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 220-225.

- Andriole, V.T. (1988) Clinical Overview of the Newer 4-Quinolone Antibacterial Agents. En *The quinolones*. 1ª edición. Ed. Andriole, V.T. pp. 155-200. Academic Press, London.
- Apley, M.D. & Upson, D.W. (1993) Lung tissue concentration and plasma pharmacokinetics of danofloxacin in calves with acute pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*, **54**, 937-943.
- Appelbaum, P.C. (1999) Quinolone activity against anaerobes. *Drugs*, **58** (suppl. 2), 60-64.
- Appelbaum, P.C.; Hunter, P.A. (2000) The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16: 5-15.
- Aramayona, J.J., Mora, J., Fraile, L.J., García, M.A., Abadía, A.R. & Bregante, M.A. (1996) Penetration of enrofloxacin and ciprofloxacin into breast milk, and pharmacokinetics of the drugs in lactating rabbits and neonatal offspring. *American Journal of Veterinary Research*, **57**, 547-553.
- Armijo, J.A. (1997) Factores patológicos que condicionan la respuesta a los fármacos. En *Farmacología Humana*. 3ª edición. Ed. Flórez, J. Masson, Barcelona.
- Armijo, J.A. & Benítez, J. (1997) Factores fisiológicos que condicionan la respuesta a los fármacos. En *Farmacología Humana*. 3ª edición. Ed. Flórez, J. Masson, Barcelona.
- Atanassova, V. & Ring, C. (1998) *Campylobacter* spp. in poultry production. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, **200**, 542-552.
- Atkinson, H. & Begg, E. (1990) Prediction of drug distribution into human milk from physicochemical characteristics. *Clinical Pharmacokinetics*. 18: 151-167.
- Atta, A.H. & Sharif, L. (1997) Pharmacokinetics of ciprofloxacin following intravenous and oral administration in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**, 326-329.

- Baggot, J.D. (1980) Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **176**, 1085-1090.
- Baggot, J.D. (2001) The bioavailability and disposition of antimicrobial agents in neonatal animals. En: Baggot, J.D. The physiological basis of veterinary clinical pharmacology. Editorial Blackwell Science. Pp: 252-266.
- Ball, P. (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 (suppl. T1), 17-24.
- Barry, A.L. (1989) *In vitro* activities of the quinolone antimicrobial agents. En *International telesymposium on quinolones*. 1ª edición. Ed. Fernandes, P.B. pp. 237-254. J.R. Prous, Barcelona.
- Bergan, T. (1988) Pharmacokinetics of fluorinated quinolones. En: The Quinolones. 1ª Edición. Ad. Andriole. V.T. pp 119-145. Academic Press, London.
- Bermingham, E.C. & Papich, M.G. (2002) Pharmacokinetics after intravenous and oral administration of enrofloxacin in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 63, (7)1012-1017.
- Bertino Jr., J. & Fish, D. (2000) The safety profile of the fluoroquinolones. *Clinical Therapeutics*. 22: 798-817.
- Bertino, J.S.; Nafziger, A.N., Wong, W. (1994) Effect of a fat-and calcium-rich breakfast on pharmacokinetics of fleroxacin administered in single and multiple doses. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 38:499-503.
- Bidgood, T.L. & Papich, M.G. (2005) Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28, (4)329-341.
- Blum, R.A. (1992) Influence of renal function on the pharmacokinetics of lomefloxacin compared with other fluoroquinolones. *The American Journal of Medicine*, **92**, 18S-21S.

- Bogan, J., Benoit, E. & Delatour, P. (1987) Pharmacokinetics of oxfendazole in goats: a comparison with sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **10**, 305-309.
- Boswell, F.J. & Wise, R. (1998) Advances in the macrolides and quinolones. *Infectious Disease Clinics of North America*, **12**, 647-670.
- Bousquet-Melou, A., Cester, C.C., Serthelon, J.P., Gruet, P. & Toutain, P.L. (1997) Pharmacodynamic study of the potential epileptic effect of combination therapy with marbofloxacin-tolfenamic acid in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 186.
- Bousquet-Melou, A., Schneider, M., Woehrlé, F. & Toutain, P.L. (2000) Safe use of marbofloxacin with medetomidine-ketamine combination in dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **23** (suppl. 1), L3.
- Bousquet-Melou, A., Bernard, S.; Schneider, M.; & Toutain, P.L. (2002) Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. *Equine Veterinary Journal*. 34: 366-372.
- Bradbury, J.M., Yavari, C.A. & Giles C.J. (1994) *In vitro* evaluation of various antimicrobials against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by de micro-brooth method, and comparison with a commercially-prepared test system. *Avian Pathology*, **23**, 105-115.
- Bregante, M.A., Saez, P., Aramayona, J.J., Fraile, L., García, M.A. & Solans, C. (1999) Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep and cows. *American Journal of Veterinary Research*, **60**, 1111-1116.
- Broome, R.L., Brooks, D.L., Babish, J.G., Copeland, D.D. & Conzelman, G.M. (1991) Pharmacokinetic properties of enrofloxacin in rabbits. *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 1835-1841.
- Brown, S.A., Cooper, J., Gauze, J.J., Greco, D.S., Weise, D.W. & Buck, J.M. (1990) Pharmacokinetics of norfloxacin in dogs after single intravenous and single and multiple oral administrations of the drug. *American Journal of Veterinary Research*, **51**, 1065-1070.

- Brown, S.A. (1996) Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**, 1-14.
- Bryskier, A. & Chantot, J.F. (1995) Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs*, **49** (suppl. 2), 16-28.
- Bugyei, K., Black, W.D. & McEwen, S. (1999) Pharmacokinetics of enrofloxacin given by the oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **63**, 193-200.
- Butaye, P., Ducatelle, R., Vermeersch, H., Remon, J.P., Haesebrouck, F. & de Backer, P. (1997) *In vitro* activities of doxycycline and enrofloxacin against European *Chlamydia psittaci* strains from turkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 2800-2801.
- Cabanes, A., Arboix, M., García, J.M. & Reig, F. (1992) Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits. *American Journal of Veterinary Research*, **53**, 2090-2093.
- Calvinho, L. (1999) El control de mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* a través de segregación. *Revista Chacra & Campo Moderno*. 828. Suplemento Tambo: 10-11.
- Carceles, C.M., Escudero, E. & Baggot, J.D. (1995) Comparative pharmacokinetics of amoxicillin/clavulanic acid combination after intravenous administration to sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 132-136.
- Carlotti, D.N., Guaguere, E., Pin, D., Jasmin, P., Thomas, E. & Guiral, V. (1999) Therapy of difficult cases of canine pyoderma with marbofloxacin: a report of 39 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **40**, 265-270.
- Carretero, M., Rodríguez, C., San Andrés, M.I., Forés, P., De Lucas, J.J., Nieto, J., Waxman, S., San Andrés, M.D. & González, F. (2002) Pharmacokinetics of marbofloxacin in adult horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*, **34**: 360-365.

- Carter, G.R.; Chengappa, M.M.; Roberts, A.W. (1995) *Staphylococcus*. En: Carter GR., Chengappa MM., Roberts AW (Ed), *Essentials of Veterinary Microbiology*. Fifth Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, p. 115-120.
- Cester, C. C., Schneider, M. & Toutain, P.L. (1996) Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: Enrofloxacin versus Marbofloxacin. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **147**, 703-706.
- Chaundhary, R.K., Srivastava, A.K. & Rampal, S. (1999) Modification of the pharmacokinetics and dosage regimen of cefuroxime by endotoxin-induced fever in buffalo calves. *Veterinary Research Communications*, **23**, 361-368.
- Cohen, S.P., McMurray, L.M.; Levy, S.B. (1988) marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 170: 5416-5422.
- Coulet, M.; Van Borssum Waalkes, M.; Leeuwkamp, O.R.; Cox, P. & Lohuis, J. (2002) Pharmacokinetics of ibafloxacin following intravenous and oral administration to healthy Beagle dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 25: 89-97.
- Coulet, M.; Morello, C.; Cox, P.; Lohuis, J. (2005) Pharmacokinetics of ibafloxacin in healthy cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 28: 37-44.
- Cox, S.K. (2007) Allometric scaling of marbofloxacin, moxifloxacin, danofloxacin and difloxacin pharmacokinetics: a retrospective analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30: 381-386.
- Cruz, A.D.; Batista, G.C.M.; Modolo, J.R.; Gottschalk, A.F. & Lopes, C.A.M. (1998) Antimicrobial activity of danofloxacin and seven other drugs against *Staphylococcus aureus* from mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria*. 50 (4):369-373.
- DANMAP (2000-2001) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. Ed. *Danish Veterinary Laboratory*. Copenhagen, Denmark.

- Dautrey, S.; Felice, K., Petiet, A.; Lacour, B., Carbon, C., Farinotti, R. (1999) Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *British Journal of Pharmacology*, 127: 1728-1734.
- De Backer, P. & Bogaert, M.G. (1983) Drug bioavailability in the developing ruminant. En *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 1ª edición. Eds. Ruckebush, Y., Toutain, P.L., Koritz, G.D. MTP Press Limited, Lancaster.
- De Backer, P. (1986) Comparative neonatal pharmacokinetics. En *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapeutics*. 1ª edición. Eds. Van Miert, A.S.J.P.A.M., Bogaert, M.G., Debackere, M. MTP Press Limited, Lancaster.
- Delatour, P., Tiberghien, M.P., Garnier, F. & Benoit, E. (1985) Comparative pharmacokinetics of febantel and its metabolites in sheep and cattle. *American Journal of Veterinary Research*, **46**, 1299-1402.
- de Lucas, J.J., Rodríguez, C., Waxman, S., González, F., de Vicente, M.L. & San Andrés, M.I. (2004) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous and intramuscular administration in young domestic ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, (2)119-122.
- de Lucas, J.J., San Andrés, M.I., González, F., Froyman, R. and Rodríguez, C. (2008) Pharmacokinetic behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Veterinary Research Communications*, 32, (4)275-279.
- De Oliveira, A.P.; Watts, J.L.; Salmon, S.A. & Aarestrup, F.M. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*. 79: 76-82.
- Deziel, M.R.; Louis, A.; Heine, H.; Bush, k.; Kao, M.; Kelley, M. & Drusano, G.L. (2001) Evaluation of levofloxacin in a hollow fiber infection model against *Bacillus anthracis* utilizing both human and Rhesus Monkey pharmacokinetic profiles. Abstracts of the 41st Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract # A-1157. Chicago, IL.

- Dimitrova, D.J., Lashev, L.D., Yanev, S.G. and Pandova, B. (2007) Pharmacokinetics of enrofloxacin in turkeys. *Research in Veterinary Science*, 82, (3)392-397.
- Dirección de Mercados Agroalimentarios. (2005) Gacetilla Informativa del Sector Agroalimentario. Tema: Mercado de la carne vacuna en el MERCOSUR. Disponible vía internet: http://www.sagpya.gov.ar/new/0-0/programas/dma/Newsletters/nro7/newsletter_00_carne-2005-06-30.php
- Dorrestein, G.M. (1992) Enrofloxacin in pet avian and exotic animal therapy. *Proceedings 1st International Baytril Symposium*, Bonn, 63-72.
- Dowling, P.M., Wilson, R.C., Tyler, J.W. & Duran, S.H. (1995) Pharmacokinetics of ciprofloxacin in ponies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 7-12.
- Dugeon, H.B. & Thomas, V. (1997) Antibacterial activity of marbofloxacin vs. enrofloxacin in an *in vitro* model simulating the kinetic profile of the drugs in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 150-151.
- Drusano, G.L.; Johnson, D.E.; Rosen, M. & Standiford, H.C. (1993) Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37:483-490.
- Dubey, G.K. & Rao, K.N.P. (1991) Some observations on the therapeutic applicability of norfloxacin in enteric colibacillosis. *Indian Veterinary Journal*, **68**, 761-764.
- Dudley, M.N. (1991) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *The American Journal of Medicine* 91 (Suppl. 6A): 45-50.
- Dunlop, R.H. (1983) Ruminal influences on drug action. *En Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 1^a edición. Eds. Ruckebush, Y., Toutain, P.L., Koritz, G.D. MTP Press Limited, Lancaster.
- Easmon, C.S.F. & Adlam, C. (1983) Staphylococci and Staphylococcal Diseases. Academic Press, London, U.K.

- Efthymiopoulos, C. (1997) Pharmacokinetics of grepafloxacin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **40** (suppl. A), 35-43.
- Eissa, S.I. (1996) Minimal inhibitory concentrations of quinolones group to some avian mycoplasmas. *Veterinary Medical Journal of Giza*, **44**, 563-568.
- Eissa, S.I., El Shater, S.A. & Dardeer, M.A.A. (1999) Efficacy of quinolones and aminoglycosides against bovine and ovine mycoplasma. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, **77**, 1361-1369.
- El Bahri, L. & Blouin, A. (1991) Fluoroquinolones: A New Family of Antimicrobials. *The Compendium of Continuing Education*, **13**, 1429-1433.
- El Banna, H.A. & El Sooud, K.A. (1998) Disposition kinetics of ciprofloxacin in lactating goats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **105**, 35-38.
- El Makarem, M.M.A. (1999) Danofloxacin as an efficient antimicoplasmal agent. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, **77**, 403-411.
- Elmas, M., Yazar, E., Tras, B., Bas, A.L. & Eryavus, A. (2000) Pharmacokinetics and oral bioavailability of enrofloxacin in faunated and defaunated goats. *Revue de Medecine Vétérinaire*, **151**, 507-510.
- Elsheikh, H.A. (1997) A comparative study of some drug-metabolizing enzymes in lungs of dromedary camels, desert sheep and nubian goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**, 469-498.
- Eltom, S.E., Babish, J.G. & Schwark, W.S, (1993a) The postnatal developement of drug-metabolizing enzymes in hepatic, pulmonary and renal tissues of the goat. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 152-163.
- Eltom, S.E., Guard, C.I. & Schwark, W.S, (1993b) The effect of age on phenylbutazone pharmacokinetics, metabolism and plasma protein binding in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 141-151.
- Encinas, T. (1993) Influencia de la gotera reticular en la biodisponibilidad de los meclofenamatos por vía oral en óvidos adultos. Tesis Doctoral. FCV. UCM.

- Endtz, H.P., Ruijs, G.J., Van Klingeren, B., Jensen, W.H., Van der Reyden, T. & Mouton, R.P. (1991) Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **27**, 199-208.
- Ernst, M.E., Ernst, E.J. & Klepser, M.E. (1997) Levofloxacin and trovafloxacin: the next generation fluoroquinolones?. *American Journal of Health System Pharmacy*, **54**, 2569-2584.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (1996) Marbofloxacin Summary Report (1).
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2008). EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-rev.1consultation. <<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/era/41828205-Rev1.pdf>>.
- Everett, M.J., Jin-YuFang, Ricci, V., Piddock, L.J.V. & Jin, Y.F. (1996) Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 2380-2386.
- Fang, W. & Pyorala, S. (1996) Mastitis-causing *Escherichia coli*: Serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. *Journal of Dairy Science*. **79**: 76-82.
- Fang, B.H., Feng, Q.H., Chen, Z.L. & Wang, Z.Q., (1999) Bioavailability and pharmacokinetics of ciprofloxacin in pigs. *Chinese Journal of Veterinary Science*, **19**, 588-590.
- Fernandes, P.B., Shipkowitz, N., Bower, R.R., Jarvis, K.P., Weisz, J. & CHU, D.T.W. (1986) *In vitro* and *in vivo* potency of five new fluoroquinolones against anaerobic bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **18**, 693-701.
- Fillastre, J.P., Montay, G., Bruno, R., Etienne, I., Dhib, M., Vivier, N., Le Roux, Y., Guimart, C., Gay, G & Schott, D. (1994) Pharmacokinetics of sparloxacin in patients with renal impairment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**, 733-737.

- Fitton, A. (1992) The Quinolones. An Overview of their Pharmacology. *Clinical Pharmacokinetics*, **22** (suppl. 1), 1-11.
- Flammer, K., Aucoin, D.P. & Whitt, D.A. (1991) Intramuscular and oral disposition of enrofloxacin in African grey parrots following single and multiple doses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **14**, 359-366.
- Forrest, A.; Nix, D.E.; Ballow, C.H.; Goss, T.F., Birmingham, M.C. & Schentag, J.J. (1993) Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 1073-1081.
- Fraile, L.J., Martínez, C., Aramayona, J.J., Abadía, A.R. & Bregante, M.A. (1993) Factores que modifican la farmacocinética durante el periodo perinatal. *Medicina Veterinaria*, 10, 393-404.
- Frazier, D. L., Thompson, L.; Trettien, A. & Evans, E. I. (2000) Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 23: 293-302.
- Friis, C. (1993) Penetration of danofloxacin into the respiratory tract tissues and secretions in calves. *American Journal of Veterinary Research*, **54**, 1122-1127.
- Gabrielsson, J. & Weiner, D. (1994) Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis. Swedish Pharmaceutical Press, 1994. SKr1000.00 (ii + 654 pp) ISBN 91 86274 54 6.
- Galinsky, R.E. & Svensson, C.K. (2003) Farmacocinética básica. En: Remington. Farmacia. Ed. Interamericana. 1288 Pp.
- Ganière, J.P; Mangion, C. & Péridy, M. (2004) Détermiantion des concentrations minimales inhibitrices et bactericides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spyramicine en solution dans du lait vis-a-vis de bacteries isolées de mammites bovines. *Revue Med*. 155 (8-9): 411-416.
- Ganière, J.P; Medaillé, C. & Etoré, F. (2004) *In vitro* antimicrobial activity of orbifloxacin agaist *Staphylococcus intermedius* isolates from canine skin and ear infections. *Research in Veterinary Science*. 77: 67-71.

- García, M.T., Pelaez, C., Giménez, M.J. & Aguilar, L. (2000) *In vitro* activity of genifloxacin vs five quinolones and two macrolides against 27 spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 2176-2178.
- García Montijano, M., Waxman, S., Sánchez, C., Quetglas, J., San Andrés, M.I., González, F. & Rodríguez, C. (2001) The disposition of marbofloxacin in common buzzards (*Buteo buteo*) after intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 24(2): 155-157.
- García-Montijano, M., Waxman, S., Lucas, J.J., Luaces, I., Zalba, J., González, F., Andrés, M.I. & Rodríguez, C. (2006) The pharmacokinetic behaviour of marbofloxacin in Eurasian buzzards (*Buteo buteo*) after intraosseous administration. *The Veterinary Journal*, 171, (3)551-555.
- García Ovando, H., Gorla, N., Luders, C., Poloni, G., Errecalde, C., Prieto, G. & Puellas, I. (1999) Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **22**, 209-212.
- García Ovando, H.G., Gorla, C., Poloni, G., Trotti, N., Prieto, G. & Errecalde, C. (2000) Intravenous pharmacokinetics of ciprofloxacin in goats. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **15**, 77-79.
- Gardner, S. Y.; Davis, J. L.; Jones, S. L.; Lafevers, D. H.; Hoskins, M. S., Mcarver, E. M. & Papich, M. G. (2004) Moxifloxacin pharmacokinetics in horses and disposition into phagocytes after oral dosing. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27: 57-60.
- Gaur, A.; Saini, S.P.; Garg, S.K.; Chaudhary, R.K.; Srivastava, A.K. (2004) Pharmacokinetics of ofloxacin after a single intravenous bolus dose in neonatal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27: 115:117.
- Gavrielli, R., Yaguil, R., Ziv, G., Creveld, C.V. & Glickman, A. (1995) Effect of water deprivation on the disposition kinetics of enrofloxacin in camels. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 333-339.

- Gehring, R. & Smith, G.W. (2006) An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **29**: 237-241.
- Giguere, S., Sweeney, R.W. & Belanger, M. (1996) Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. *American Journal of Veterinary Research*, **57**, 1025-1030.
- Giles, C.J., Grimshaw, W.T.R., Shanks, D.J. & Smith, D.G. (1991a) Efficacy of danofloxacin in the therapy of acute bacterial pneumonia in housed beef cattle. *Veterinary Record*, **13**, 296-300.
- Giles, C.J., Magonigle, R.A., Grimshaw, W.T.R., Tanner, A.C., Risk, J.E., Lynch, M.J. & Rice, J.R. (1991b) Clinical pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **14**, 400-410.
- Gips, M. & Soback, S. (1996) Norfloxacin nicotinate pharmacokinetics in unweaned and weaned calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**, 130-134.
- Gips, M. & Soback, S. (1999) Norfloxacin pharmacokinetics in lactating cows with sub-clinical and clinical mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **22**, 202-208.
- González, F., Rodríguez, C., Nieto, J., Vicente, M.L., San Andrés, M.D. & San Andrés, M.I. (1997) Age related differences in norfloxacin pharmacokinetic behaviour following intravenous and oral administration in sheep. *The Veterinary Quarterly*, **19**, 145-150.
- González, F., San Andrés, M.I., Nieto, J., San Andrés, M.D., Waxman, S., De Vicente, M.L., Lucas, J.J. & Rodríguez, C. (2001) Influence of ruminal distribution on norfloxacin pharmacokinetics in adult sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **24**, 241-245.

- Gootz, T.D., McGuirk, P.R., Moynihon, M.S. & Haskell, S.L. (1994) Placement of alkyl substituents on the C/ piperazine ring of fluoroquinolones: Dramatic differential effects on mammalian topoisomerase II and DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 130-133.
- Goudah, A. & Mouneir, S.M. (2008) Comparative pharmacokinetics of difloxacin in goat kids and lambs. *Small Ruminant Research*. 78: 186-198.
- Granneman, G.R. & Guay, D.R. (1991) The influence of age on the pharmacokinetics of temafloxacin. *American Journal of Medicine*, **91**, 71S-75S.
- Griggs, D.J., Hall, M.C., Jin, Y.F. & Piddock, L.J.V. (1994) Quinolone resistance of veterinary isolates of salmonella. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **33**, 1173-1189.
- Gruet, P., Thomas, E., Deleforge, J., Thomas, V., Boisramé, B. & Lecoindre, P. (1994) Actualités en antibiothérapie des infections dermiques du chat: intérêt de la marbofloxacin. 1^{er} Congrès Européen CNVSPA-FECAVA, Paris.
- Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X. & Kaltsatos, V. (2001) Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*. 50: 245-259.
- Gürtler, H., Ketz, A., Kolb, E., Schröder, L & Seidel, H. (1987) Fisiología de la digestión y la absorción. En *Fisiología Veterinaria*. 1^a edición. Ed. Kolb, E. pp. 217-419. Acribia, Zaragoza.
- Guthrie, R.M.; Jacobs, M.; Low, D.E.; Mandell, L., Slama, T. (2004) Treating resistant respiratory infections in the primary care setting: the role of the new quinolones. University of Cincinnati College of Medicine Continuing Medical Education.
- Haines, G.R., Brown, M.P., Gronwall, R.R. & Merritt, K.A. (2000) Serum concentrations and pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intragastric administration to mares. *Canadian Journal Veterinary Research*, **64**, 171-177.

- Hamana, M., Sekine, F. & Miyahara, M. (1994) Therapeutic efficacy of orbifloxacin (AT-4526), a new injectable quinolone, in neonatal diarrhoea in piglets. *Tohoku Journal of Veterinary Clinics*, **17**, 8-16.
- Hannan, P.C.T. (1990) Treatment of experimental enzootic pneumonia of the pig by norfloxacin or its 6-chloro analogue. *Research in Veterinary Science*, **49**, 203-210.
- Hardy, D., Amsterdam, D., Mandell, L.A. & Rotstein, C. (2000) Comparative *in vitro* activities of ciprofloxacin, genifloxacin, grepafloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin and other antimicrobial agents against bloodstream isolates of gram-positive cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 802-805.
- Haritova, A., Lashev, L. and Pashov, D. (2003) Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep. *Research in Veterinary Science*, **74**, (3)241-245.
- Harron, D.W.G., Nation, G., Tinson, A.H., Dhanasekharan, S. & Sheen, R. (1997) Effects of administration routes and dose on the pharmacokinetics of enrofloxacin in young and mature camels. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 54-55.
- Hasegawa, T., Takagi, K. & Kitaichi, K. (1999) Effects of bacterial endotoxin on drugs pharmacokinetics. *Nagoya Journal of Medical Sciences*, **62**, 11-28.
- Hassouan, M.K. (2006) Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal. Tesis. Departamento de química analítica. Universidad de Granada.
- Hautekeete, M.L., Kocky, M.M., Naegels, S., Holvoet, J.K., Hubens, H. & Kloppel, G. (1995) Cholestatic hepatitis related to quinolones: a report of two cases. *Journal of Hepatology*, **23**, 59-60.
- Heinen, E. (2002) Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin and orbifloxacin in dogs after single oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **25**: 1-5.

- Hennessy, D.R., Sangster, N.C., Steel, J.W. & Collins, G.H. (1993a) Comaparative kinetic disposition of oxfendazole in sheep and goats before and during infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 245-253.
- Hennessy, D.R., Sangster, N.C., Steel, J.W. & Collins, G.H. (1993b) Comparative pharmacokinetic disposition of closantel in sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 254-260.
- Hogan, J.S.; Gonzalez, N.R.; Harmon, R.J.; Nickerson, S.C.; Oliver, S.P.; Pankey, J.W.; Smith, K.L. (1999) Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc. Madison, WI, p. 222.
- Hooper, D.C. & Wolfson, J.S. (1993) Mechanisms of bacterial resistance to quinolones. In *Quinolone antimicrobial agents*. 2^a edición. Eds. Hooper, D.C., Wolfson, J.S. pp. 97-118. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Hooper, D.C. (1995) Quinolone mode of action. *Drugs*, **49** (suppl. 2), 10-15.
- Hooper, D.C. (1998) Mechanisms of Quinolone Resistance. En *Use of Quinolones in Food and Potential Impact on Human Health. Report and Proceedings of a WHO Meeting*. Geneva, Switzerland. 2-5 June 1998.
- Hu, X.; Luo, Y. & Zhou, Q. (2010) Simultaneous analysis of selected typical antibiotics in manure by microwave-assisted extraction and LC-MS. *Chromatographia*. **71**: 217-223.
- Hummler, H., Richter, W.F. & Hendrickx, A.G. (1993) Developmental toxicity of fleroxacin and comparative pharmacokinetics of four fluoroquinolones in the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, **122**, 34-45.
- Idowu, O.R.; Peggins, J.O.; Cullison, R. & von Bredow, J. (2010) Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Res.Vet.Sci.* **89**:230-235.

- Ingerman, M.J., Pitsakis, P.G., Rosenberg, A.F. & Levison, M.E. (1986) The importance of pharmacodynamics in determining the dosing interval in therapy for experimental pseudomonas endocarditis in the rat. *The Journal of Infectious Diseases*, **153**, 704-714.
- Intorre, L., Vanni, M.; Di Bello, D.; Pretti, C.; Meucci, v.; Tognetti, R.; Soldani, G.; Cardini, G. & Jousson, O. (2007) Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30: 464-469.
- Ismail, M. & El-Kattan, Y. A. (2007) Comparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and *Mannheimia haemolytica* infected calves. *Research in Veterinary Science*. 82:398-404.
- Jenkins, W.L.; Davis, L.I.E. & Boulos, B.M. (1975) Transfer of drugs across the ruminal wall in goats. *American Journal of Veterinary Research*, **36**, 1771-1776.
- Jernigan, A.D., Hatch, R.C., Wilson, R.C., Brown, J. & Tuler, S. (1988b) Pharmacokinetics of gentamicin in cats given *Escherichia coli* endotoxin. *American Journal of Veterinary Research*, **49**, 603-607.
- Jha, K., Roy, B.K. & Singh, R.C.P. (1996) The effect of induced fever on the biokinetics of norfloxacin and its interaction with probenecid in goats. *Vet. Res. Commun*, **20**, 473-479.
- Jiang, Z.Q., Fang, L.A., Zeng, W.D., Cheng, W.J. & Xu, J.G. (1998) Efficacy of fleroxacin against *Mycoplasma gallisepticum* in chicks. *Chinese Journal of Veterinary Science*, **18**, 262-264.
- Johnson, R.D.; Dorr, M.B.; Hunt, T.L.; Jensen, B.K. & Talbot, G.H. (1999) Effects of food on the pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clinical therap*. 21 (6): 982-991.

- Jones, M.E., Sahm, D.F., Martin, M., Schewring, S., Heisig, P., Thornsberry, C., Kjöhrer, K. & Schmitz, F.J. (2000) Prevalence of gyrA, gyrB, parC, and parE mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 462-466.
- Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K. & Froyman, R. (1993a) A model for testing the efficacy of enrofloxacin administered to turkey hens in the control of *Mycoplasma iowae* infection in eggs and embryos. *Avian Disease*, **37**, 1057-1061.
- Jordan, F.T.W., Horrocks, B.K., Jones, S.K., Cooper, A.C. & Giles, C.J. (1993b) A comparison of the efficacy of danofloxacin and tylosin in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 79-86.
- Kaartinen, L., Salonen, M., Älli, L. & Pyörälä, S. (1995) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injection in lactating cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **18**, 357-362.
- Kaartinen, L., Panu, S. & Pyörälä, S. (1997a) Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*, **29**, 378-381.
- Kaartinen, L., Pyörälä, S., Moilanen, M. & Raisanen, S. (1997b) Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**, 479-482.
- Kamberi, M.; Tsutsumi, K.; Kotegawa, T.; Kawano, K.; Nakamura, K.; Niki, Y. & Nakano, S. (1999) Influences of Urinary pH on Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Humans and Antimicrobial Activity In Vitro versus Those of Sparfloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43(3): 525-529.
- Keck, G. & Borne, P.M. (1995) Nouvelles conceptions en antibiothérapie et leurs applications pratiques en médecine vétérinaire. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **146**, 309-320.

- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L. and Bousquet-Melou, A. (2009) Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, (11)4740-4748.
- Kempf, Y., Van der Hoven, R., Gesbert, F. & Guittet, M. (1998) Efficacy of difloxacin in growing broiler chickens for the control of infection due to pathogenic *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Veterinary Medicine B*, **45**, 305-310.
- Kietzmann, M.; Braun, M.; Schneider, M. & Pankow, R. (2008) Tissue distribution of marbofloxacin after "systemic" administration into the isolated perfused bovine udder. *The Veterinary Journal*. 178: 115-118.
- Kinabo, L.D. and McKellar, Q.A. (1989) Current models in pharmacokinetics: applications in veterinary pharmacology. *Veterinary Research Communications*, 13, (2)141-157.
- Khodursky, A.B.; Zechiedrich, E.K. & Cozzarelli, N.R. (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proceedings for the National Academy of Sciences United States of the America*. 92: 11801-11805.
- Knoll, U., Glunder, G. & Kietzmann, M. (1999) Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **22**, 239-246.
- Knowles, T.; Edwards, J.; Bazeley, K.; Brown, S.; Butterworth, A. & Warriss, P. (2000) changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *The Veterinary Record*. 147: 593-598.
- Kozawa, O., Uematsu, T., Matsuno, H., Niwa, M., Nagashima, S. & Kanamaru, M. (1996) Comparative study of pharmacokinetics of two new fluoroquinolones, balofloxacin and grepafloxacin, in elderly subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 2824-2828.
- Kummerer, K. (2004) Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemother.* 54: 311-320-

- Kung, K., Riond, J.L. & Wanner, M. (1993) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *J.Vet.Pharmacol.Therap.*, **16**, 462-468.
- Laczay, P.; Semjén, G.; Nagy, G & Lehel, J. (1998) comparative studies on the pharmacokinetics of norfloxacin in chickens, turkeys and geese after a single oral administration. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* **21**: 161-164.
- Lavy, E., Ziv, G. & Glickman, A. (1995) Intravenous disposition kinetics, oral and intramuscular bioavailability and urinary excretion of norfloxacin nicotinate in donkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **18**, 101-107.
- Lecoeur Bitchatchi, S & Kolf Clauw, M. (1998) Les nouvelles quinolones en médecine vétérinaire. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **175**, 7-15.
- Leek, B.F. (1999) Digestión en el estómago del rumiante. *En Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. 3ª edición. Ed. Swenson, M.J. & Reece, W.D. pp. 387-416. Uteha.
- Lefebvre, H.P., Schneider, M., Dupouy, V., Laroute, V., Costes, G., Delesalle, L. & Toutain, P.L. (1998) Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**, 453-461.
- Leshner, G.Y.; Foelich, E.J.; Gruett, M.D.; Baily, J.H. & Brundage, P.R. (1962) 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Pharmacology and Chemistry*. **91**: 1063-1065.
- Lindberg, R.H.; Wenneberg, P.; Johansson, M.I.; Tysklind, M. & Anderson, B.A.V. (2005) Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science Technology*. **39**: 3421-3429.
- Lindecrona, R.H., Friis, C. & Nielsen, J.P. (2000) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin into the gastrointestinal tract in healthy and *Salmonella typhimurium* infected pigs. *Research in Veterinary Sciences*, **68**, 211-216.

- Llovería, P.R. (1992) Estudio farmacocinético de las curvas de nivel plasmático elaboradas tras la administración de una dosis única por vía endovenosa de ciprofloxacina en oveja. Memoria de Grado de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- Lode, H.; Borner, K. & Koeppe, P. (1998) Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 27:33-39.
- Lomaestro, B.M. & Bailie, G.R. (1995) Absorption interactions with fluoroquinolones. *Drug Safety*, **12**, 314-333.
- Luders, C.; Baroni, E.; Rubio, S.; De Lucas, J.; Diaz, D.; San Andrés, M.I. (2012) Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic indices of marbofloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administrations in buffalo calves (<10 days old). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01325.x).
- MacGowan, A. & Bowker, K. (2002) Developments in PK/PD: optimizing efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in *in vitro* models. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 19: 291-298.
- Madaras-Kellu, K.J.; Ostergaard, E.W.; Baeker Hovde, L. & Rotschafer, J.C. (1996) Twenty-four hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 627-632.
- Malbe, M., Salonen, M., Fang, W., Ööpik, T., Jalakas, M., Klassen, M. & Sandholm, M. (1996) Disposition of enrofloxacin (Baytril®) into the udder after intravenous and intra-arterial injections into dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine A*, **43**, 377-386.
- Malorny, B., Schroeter, A. & Helmuth, R. (1999) Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 2278-2286.
- Mann, D.D. & Frame, G.M. (1992) Pharmacokinetic study of danofloxacin in cattle and swine. *American Journal of Veterinary Medicine*, **53**, 1022-1026.

- Manual Merck. 6ª Edición en Español. (2007) Guía de referencia. Editorial Océano/Centrum. Tomo 2: 2548.
- Marangos, M.N., Zhu, Z., Nicolau, D.P., Klepser, M.E. & Nightingale, C.H. (1997) Disposition of ofloxacin in female New Zealand white rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**, 17-20.
- Marbofloxacin Reference Book (1999) Laboratorios Vétoquinol, Lure, France.
- Marin, P.; Escudero, E.; Fernández-Varón, E.; Cárcelos, C.M.; Corrales, J.C.; Gómez-Martín, A. & Martínez, I. (2010) Short communication: Fluoroquinolone susceptibility of Staphylococcus strains isolated from caprine clinical mastitis in southeast Spain. *Journal of Dairy Science*. 93: 5243-5245.
- Marshall, A.J. & Piddock, L.J. (1994) Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **34**, 465-483.
- Martín Martín, F.R. (2008) Farmacocinética no compartimental. En: Aguilar, R. Biofarmacia y farmacocinética: ejercicios y problemas resueltos. Edit. Elsevier España. 292 pp.
- Martin Barrasa, J., Lupioloa Gómez, P., González Lama, Z. & Tejedor Junco, M. (2000) Antibacterial susceptibility patterns of pseudomonas strains isolated from chronic canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine B*, **47**, 191-196.
- Martínez Larrañaga, M., Díaz, M., Fernández Cruz, M., Frejo, M., Fernández, R., Fernández, M., Sevil, B. & Anadón, A. (1997a) Pharmacokinetics of marbofloxacin in Broiler chickens after intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 181.
- Martínez Larrañaga, M.R., Díaz, M.J., Martínez, M.A., Frejo, M.T., Bringas, P. & Anadón, A. (1997b) Bioavailability of enrofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* **20** (suppl. 1), 52.
- Martínez, M.; McDermott, P. & Walker, R. (2006) Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*: 172: 10-28.

- Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Jacoby, G.A. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*: 797-799.
- Matsunaga, Y., Miyazaki, H., Oh-e Y., Nambu, K., Furukawa, H., Yoshida, K. & Hashimoto, M. (1991) Disposition and metabolism of ¹⁴C sparfloxacin in the rat. *Arzneimittelforschung*, **41**, 747-759.
- Maxwell, A.; Critchlow, S.E. (1998) Mode of action. In: Kuhlman, J.; Zeiler, H.J. (Eds.) Quinolone antibacterials. Springer. Berlin. pp 119-166.
- McKellar, Q.A. (1996) Clinical relevance of pharmacologic properties of fluoroquinolones. *Compendium of Continuing Education for Practising Veterinarians*. 18 (Suppl.) 14-21.
- McKellar, Q.A., Gibson, I.F. & McCormack, R.Z. (1998) Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **19**, 123-129.
- McKellar, Q.A., Sanchez Bruni, S.F., Jones, D.G. (2004) Pharmacokinetic /pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **27**, 503-514.
- Mediavilla, A., Flórez, J & García-Lobo, J.M. (1997) Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. En *Farmacología Humana*. 3ª ed. Ed. Flórez, J. pp. 1061-1083. Masson, Barcelona.
- Melander, A. (1981) Food intake and drug bioavailability. *In Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 77: Nutrition in health and disease and international development: symposia from the XII International Congress of Nutrition, San Diego, pp. 747-756. Alan Liss Inc, New York.
- Mengozi, G., Intorre, L., Bertini, S. & Soldani, G. (1996) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep. *The American Journal of Veterinary Research*, **57**, 1040-1043.

- Meunier, D.; Acar, J.F.; Martel, J.L.; Kroemer, S. & Vallé, M. (2004) Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24: 70-80.
- Mevius, D.J., Breukink, H.J., Guelen, P.J.M., Jansen, T. & De Grève, B. (1990) Pharmacokinetics, metabolism and renal clearance of flumequine in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **13**, 159-169.
- Mitscher, L.A., Zavod, R.M. & Sharma, P.N. (1989) Structure-activity relationships of the newer quinolone antibacterial agents. En *International telesymposium on quinolones*. 1st edición. Ed. Fernandes, P.B. pp. 3-19. J.R. Prous, Barcelona.
- Mizuki, Y.; Fujiwara, I.; Yamaguchi, T.; Sekine, Y. (1996) Structure-related inhibitory effect of antimicrobial noxacin and derivatives on theophylline metabolism by rat liver microsomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 1875-1880.
- Mohri, M.; sharifi, K. & Eidi, S. (2007) Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. *Research in Veterinary Science*. 83: 30-39.
- Monlouis, J.; De Jong, A.; Limet, A. & Richez, P. (1997) Plasma pharmacokinetics and urine concentrations of enrofloxacin after oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 20 (S. 1) 61-63-
- Moutafchieva, R. & Djouvinov, D. (1997) Pharmacokinetics of pefloxacin in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20**, 405-407.
- Mouton, J.W.; Dudley, M.N.; Cars, O.; Derendorf, H. & Drusano, G.L. (2002) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19: 355-358.
- Mouton, J.; Dudley, M.; Cars, O.; Derendorf, H. & Drusano, G.L. (2005) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 601-607.

- Muñoz Bellido, J.L., Alonso Manzanares, M.A., Yague Guirao, G., Gutierrez Zufiaurre, M.N., Toldos, M.C., Segovia Hernández, M. & García Rodríguez, J.A. (1999) *In vitro* activity of 13 fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus* isolates with characterized mutations in gyrA, gyrB, grlA and norA and against wild-type isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 966-968.
- Murayama, S., Hara, Y., Ally, A., Suzuki, T. & Tamagawa, M. (1992) Central stimulating effect of the combination of the new quinolones group of antimicrobials and non-steroidal antiinflammatory drugs in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **99**, 13-18.
- Musso, D., Drancourt, M., Osscini, S. & Raoult, D. (1996) Sequence of quinolone resistance-determining region of gyrA gene for clinical isolates and for an *in vitro*-selected quinolone-resistant strain of *coxiella burnetti*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 870-873.
- Nadai, M., Sekido, T., Matsuda, Y., Li, W., Kitaichi, K., Itoh, A., Nabeshima, T. & Hasegawa, T. (1998) Time-dependent effects of *Klebsiella pneumoniae* endotoxin on hepatic drug-metabolizing enzyme activity in rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **50**, 871-879.
- Nakagawa, T., Ishigai, M., Kato, M., Hayakawa, N., Kinoshita, H., Okutomi, T., Ohkubo, K & Okazaki, A. (1995) Pharmacokinetics of the new fluoroquinolone balofloxacin in mice, rats and dogs. *Arzneimittelforschung*, **45**, 719-722.
- Neu, H.C. (1989) Synergy of fluoroquinolones with other antimicrobial agents. *Review of Infectious Diseases*, **11** (suppl. 5), S1025-1035.
- Neuman, M. (1987) Relationship between chemical structure of antibiotics and pharmacokinetics. *Drugs Experimental and Clinical Research*. XIII (3) 115-124.
- Neuman, M. (1988) Clinical Pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clinical Pharmacokinetics*, **14**, 96-121.
- Nicholas, R., Backer, S., Ayling, R. & Stipkovits, L. (2000) Mycoplasma infections in growing cattle. *Cattle Practice*, **8**, 115-118.

- Nicolle, L.E. (1999) Quinolones in the aged. *Drugs*, **58** (suppl. 2), 49-51.
- Nielsen, P. & Gyrd Hansen, N. (1997) Bioavailability of enrofloxacin after oral administration to fed and fasted pigs. *Pharmacology and Toxicol.*, **80**, 246-250.
- Nightingale, C.H.; Grant, E.M. & Quintiliani, R. (2000) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of levofloxacin. *Chemotherapy*. 46 (Suppl. 1): 6-14.
- Norris, S. & Mandell, G.L. (1988) The Quinolones, History and overview. En *The quinolones*. 1ª edición. Ed. Andriole, V.T. pp. 1-22. Academic Press, London.
- Nouws, J.F.M. (1991) Pharmacokinetics of sulphametoxazole in calves and cows. *Vet.Q.* 13, 10-15.
- Nouws, J.F.M. (1992) Pharmacokinetics in Immature Animals: A Review. *J.Anim.Sci.* **70**, 3627-3634.
- O'Dwyer, S.T., Michie, H.R., Ziegler, T.R., Revhaug, A., Smith, R.J. & Wilmore, D.W. (1988) A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. *Archives of Surgery*, **123**, 1459-1464.
- Okezaki, E., Teresaki, T., Nakamura, M., Nagata, O., Kato, H. & Tsuji, A. (1989) Serum protein binding of lomefloxacin, a new antimicrobial agent, and its related quinolones. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78**, 504-507.
- Okusu, H.; Ma, D. & Nikaido, H. (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*. 178: 306-308.
- Okuyama, Y., Momota, K & Morino, A. (1997) Pharmacokinetics of prulifloxacin. 1st communication: absorption, distribution and excretion in rats, dogs and monkeys after a single administration. *Arzneimittelforschung*, **47**, 276-284.
- Olofsson, S.K., Marcusson L.L., Komp Lindgren P., Hughes, D., Cars, O. (2006). Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an *in vitro* kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 1116–1121

- Orlando, R., Sawadogo, A., Miglioli, P.A., Cappellazzo, M.G. & Palatini, P. (1992) Oral disposition kinetics of ofloxacin in patients with compensated liver cirrhosis. *Chemotherapy*, **38**, 1-6.
- Owens Jr. R.C.; Ambrose, P.G. (2002) Pharmacodynamics of quinolones. In: Nightingale, c. H.; Murakawa, t.; Owens Jr., R.C. (Eds.) *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY. Pp 155-176.
- Park, S.C., Yun, H.I., Choi, Y.Y. & Oh, T.K. (1994) Pharmacokinetics of norfloxacin in horses and rabbits after intravenous, intramuscular or oral administration. *Proceedings of the 6th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*, Edimburgo, pp. 46-47.
- Park, S.C., Yun, H.I. & Oh, T.K. (1997) Comparative pharmacokinetics of norfloxacin-glycine acetate in rabbits, horses, pigs and flounders after oral, intramuscular or intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 66-67.
- Pellerin, J.L., Bordeau, P., Sebbag, H. & Person, J.M. (1998) Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **21**, 115-133.
- Pengov, A. (2001) The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. And associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 84: 572-574.
- Pengov, A.; Ceru, S. & Jurcevic, A. (2001) Treatment of bovine udder infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Slovenian Vet. Research*. 38: 151-159.
- Pengov, A. & Ceru, S. (2003) Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. 86: 3157-3163.
- Percival, A. (1991) Impact of chemical structure on quinolone potency, spectrum and side effects. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 28 (Suppl): 1-8.

- Petracca, K., Riond, J.L., Graser, T. & Wanner, m. (1993) Pharmacokinetics of the gyrase inhibitor marbofloxacin: influence of pregnancy and lactation in sows. *Journal of Veterinary Medicine*, **40**, 73-79.
- Phuektes, P.; Mansell, P.D. & Browning, G. (2001) Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 84: 1140-1148.
- Pickerill, K.E.; Paladino, J.A. & Schentag, J.J. (2000) Comparison of the fluoroquinolones based on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Pharmacotherapy*. 20_417-428.
- Phillips, I., King, A & Shannon, K. (1988) *In vitro* properties of the Quinolones. En *The quinolones*. 1ª edición. Ed. Andriole, V.T. pp. 83-117. Academic Press, London.
- Piddock, L.J.V. & Wise, R. (1989) Mechanisms of resistance to quinolones and clinical perspectives. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **23**, 475-483.
- Piddock, L.J.V. (1995) Mechanisms of resistance to fluoroquinolones, state-of-the-art 1992-1994. *Drugs*, **49** (suppl. 2), 29-35.
- Pijpers, A., Vernooy, J., Cruijsem, A., Van Leengoed, L., Koeman, J., Hessels, A., Vandenhoeck, J. & Verheijden, J. (1994) Efficacy of parenteral treatment with oxitetracycline and enrofloxacin against *A. pleuropneumoniae* in swine. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)*, Edinburgo, p. 93.
- Pijpers, A., Heinen, E., Jong, A. & Verheijden, J.H.M. (1997) Enrofloxacin pharmacokinetics after intravenous and intramuscular administration in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 42-43.
- Pirro, F.; Edingloh, M. & Schmeer, N. (1999) Bactericidal and inhibitory activity of enrofloxacin and other fluoroquinolones in small animal pathogens. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 21 (Supl. 12M): 19-25.

- Poole, K. (2000) Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 2233-2241.
- Rabbaa, L.; Dautrey, S., Colas-Linhart, N.; Carbon, C., Farinotti, R. (1997) Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 2274-2277.
- Rebuelto, M.; Otero, P.; Albarellos, G.; Ambros, L.; Kreil, V.; Waxman, S.; Montoya, L. & Hallu, R. (2000) Pharmacokinetics of fleroxacin in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 23: 103-105.
- Richez, P., Pedersen Morner, A., De Jong, A. & Monlouis, J.D. (1997a) Validation of a therapeutic regimen for enrofloxacin in cats on the basis of pharmacokinetic data. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 152-153.
- Richez, P., Pedersen Morner, A., De Jong, A. & Monlouis, J. (1997b) Plasma pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin and enrofloxacin in pigs. *J. of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 41-42.
- Riley, C.M.; Kindberg, c. G. & Stella, V.J. (1989) The physicochemical properties of quinolone antimicrobials variously substituted at C.7. Implications in the development of liquid dosage forms. En: International telesymposium on quinolones. 1ª Edición. Ed. Fernandes, P.B. pp 21-36. J.R. Prous, Barcelona.
- Robicsek, A.; Jacoby, G. & Hooper, D.C. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious diseases*. 6:629-640.
- Robson, R.A. (1992) The effects of quinolones on xanthine pharmacokinetics. *The American Journal of Medicine*, **92**, 22S-25S.
- Rodríguez Cruz, M.S., González Alonso, I., Sánchez Navarro, A. & Sayalero Marinero, M.L. (1999) *In vitro* study of the interaction between quinolones and polyvalent cations. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, **73**, 237-245.
- Rothlin, R.P. (1999) Quinolonas, revisión histórica. *Medicina Buenos Aires*, **59** (supl. 1), 3-7.

- Ruiz Serrano, M.J., Alcalá, L., Martínez, L., Díaz, M., Marín, M., González Abad, M.J. & Bouza, E. (2000) *In vitro* activities of six fluoroquinolones against 250 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* susceptible or resistant to first line antituberculosis drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 256-2568.
- Sadowski, D.C. (1994) Drug interactions with antacids. Mechanisms and clinical significance. *Drug Safety*, **11**, 395-407.
- Salam Abdullah, A. & Baggot, J.D. (1986) Influence of induced disease states on the disposition kinetics of imidocarb in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **9**, 192-197.
- San Andrés. M.D. (1992) Influencia del calcio en la contracción del músculo liso del suelo de la gotera reticular bovina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Sasabe, H., Kato, Y., Terasaki, T., Tsuji, A. & Sugiyama, Y. (1999) Differences in the hepatobiliary transport of two quinolone antibiotics, grepafloxacin and lomefloxacin, in the rat. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **20**, 151-158.
- Schentag, J.J.; Gilliland, K.K. & Paladino, J.A. (2001) What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories? *Clinical Infectious diseases*. 32: S39-S46.
- Schlegelva, J.; Sediva, I. & Rysanek, D. (2002) Prevalence and resistance to antimicrobial drugs in selected microbial species isolated from milk samples. *Journal of Veterinary Medicine*. 49: 216-225.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina (2009). Disponible vía internet : <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2008) Cuadro de estratificación bovina por provincia. Disponible vía internet: http://www.senasa.gov.ar/indicadores/actual/1_indicadores_de_ganaderia_bovina/cuadro_estratificacion_bovina_por_provincia.xls

- Schneider, M., Thomas, V., Boisramé, B. & Deleforge, J. (1996) Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**, 56-61.
- Schneider, M., Woehrlé, F. & Boisramé, B. (2000) Pharmacokinetics of marbofloxacin in rabbits. *J.Vet.Pharmacol.Therap.***23** (suppl. 1), B42.
- Schneider, M., Vallé, M., Woehrlé, F. & Boisramé, B. (2004) Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administrations and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *J. Dairy Sci.* 87: 202-211.
- Schwark, S.W. (1992) Factors that affect drug disposition in food-producing animals during maturation. *J.Anim.Sci.* 70: 3635-3645.
- Schwartz, G. (1978) Estimating the dimension of a model, *Annals of Statistics* 6, pp. 461–464.
- Scott, P.R. (1997) Epidemiology and treatment of bovine respiratory disease in beef cattle. *Cattle Practice*, **5**, 283-288.
- Semrad, S.D., McClure, J.T., Sams, R.A.. & Kaminski, L.M. (1993) Pharmacokinetics and effects of repeated administration of phenylbutazone in neonatal calves. *American Journal of Veterinary Research*, **54**, 1906-1912.
- Shem Tov, M. & Ziv, G. (1994) Clinical pharmacokinetic characterization of norfloxacin nicotinate in swine following systemic administration. *Journal of Veterinary Medicine B*, **41**, 60-70.
- Shem Tov, M., Ziv, G., Glickman, A.; Saran, A. & Bor, A. (1995) Penetration of marbofloxacin and danofloxacin from blood into the milk of lactating ewes after intravenous and intramuscular administration. En: Saran, A. & Soback, S. (Eds.) *Proc. 3rd Intern. Mastitis Seminar*, Tel-Aviv, Israel. Intern. Dairy Fe., Brussels. Pp 132-133.

- Shem Tov, M., Ziv, G., Glickman, A. & Saran, A. (1997a) Pharmacokinetics and penetration of marbofloxacin from the blood into the milk of cows and ewes. *Journal of Veterinary Medicine*, **44**, 511-519.
- Shem-Tov, M., Ziv, G., Glickman, A. & Saran, A. (1997b) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of ewes. *Veterinary Research*, **28**, 571-579.
- Shem-Tov, M., Rav, M., Hon, O., Ziv, G., Glickman, A & Saran, A. (1998) Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **21**, 209-213.
- Shimoda, K. (1998) Mechanisms of quinolone phototoxicity. *Toxicology Letters*, **102-103**, 369-373.
- Shlosberg, A., Ershov, E., Bellaiche, M., Hanji, V., Weisman, Y & Soback, S. (1997) The inhibitory effects of the fluoroquinolone antimicrobials norfloxacin and enrofloxacin on hepatic microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in broiler chickens. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, **14**, 109-122.
- Shojaee Aliabadi, F. & Lees, P. (1997) Pharmacodynamics of marbofloxacin in calves: evaluation in a tissue cage model. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 48-49.
- Shojaee Aliabadi, F. & Lees, P. (2002) Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* 25: 161-174.
- Shojaee Aliabadi, F. Landoni, M.F. & Lees, P. (2003) Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD), and PK/PD integration of danofloxacin in sheep biological fluids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (2): 626-635.
- Short, C. R. & Clarke, C.R. (1984) Calculation of dosage regimens of antimicrobial drugs for the neonatal patient. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **185**, 1088-1093.

- Sidhu, P.K.; Landoni, M.F.; Lees, P. (2005) Influence of marbofloxacin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolafenamic acid in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28: 109-119.
- Sidhu, P.K.; Landoni, M.F.; Aliabadi, M.H.S. & Lees, P. (2010a) PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Research in Pharmacology Science*. 88: 134-141.
- Sidhu, P.K.; Landoni, M.F.; Aliabadi, M.H.S. & Lees, P. (2010b) Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolafenamic acid in goats. *The Veterinary Journal*. 184: 219-229.
- Sidhu, P.K.; Landoni, M.F.; Aliabadi, M.H.S.; Toutain, P.L.; Lees, P. (2010c) Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolafenamic acid in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34 (4) 376-387.
- Singh, R.P., Srivastava, A.K., Sharma, S.K. & Nauriyal, D.C. (1997) Pharmacokinetics and urinary excretion of cephaloridine in febrile crossbreed calves. *Indian Journal of Animal Sciences*, **67**, 949-952.
- Smith, J.T. & Lewin, C.S. (1988) Chemistry and Mechanisms of Action of the Quinolone antibacterials. En: the quinolones. 1ª Edición. Ed. Andriole, v.T. pp 23-82. Academic press, London.
- Soback, S., Gips, M., Bialer, M. & Bor, A. (1994) Effect of lactation on single-dose pharmacokinetics of norfloxacin nicotinate in ewes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**, 2336-2339.
- Sobhy, H.M., Riad, E.M. & El Khouly, N.A. (2000) Antibacterial efficacy and pharmacokinetic studies of ciprofloxacin on *Pasteurella multocida* infected rabbits. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **107**, 151-155.
- Soliman, G.A. (2000) Tissue distribution and disposition kinetics of enrofloxacin in healthy and *E. coli* infected broilers. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **107**, 23-27.

- Sörgel, F & Kinzig, M. (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors, Part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *American Journal of Medicine*, **94**, 56-69.
- Speltini, A.; Sturini, M.; Maraschi, F. & Profumo, A. (2010) Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters. Simple preparation and determination. *Journal of separation Science*. 33:1115-1131.
- Spreng, M.; Deleforge, J.; Thomas, V.; Boisrame, B., Dugeon, H. (1995) Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 18: 284-289.
- Stahlmann, R & Lode, H. (1988) Safety overview: Toxicity, Adverse Effects and Drug Interactions. En *The quinolones*. 1ª edición. Ed. Andriole, V.T. pp. 201-223.. Academic Press, London.
- Stahlman, R., Kuhner, S., Shakibaei, M., Schwabe, R., Flores, J., Evander, S.A. & Van Sickle, D.C. (2000) Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature Beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. *Archives of Toxicology*, **73**, 564-572.
- Stegemann, M., Wollen, T.S., Ewert, K.M., Terhune, T.N. & Copeland D.D. (1997) Plasma pharmacokinetics of enrofloxacin administered to cattle at a dose of 7,5 mg/kg. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 21-86.
- Stroshane, R.M., Silverman, M.H., Sauerschell, R., Brown, R.R., Boddy, A.W. & Cook, J.A. (1990) Preliminary study of the pharmacokinetics of oral amifloxacin in elderly subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**, 751-754.
- Sturini, M.; Speltini, A.; Maraschi, F.; Rivagli, E. & Profumo, A. (2010) Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. *Journal of Chromatography A*. 1217: 7316-7322.

- Sukul, P.; Lamshoft, M.; Kusari, s.; Zuhlke, S. & Spiteller, S. (2009) Metabolism and excretion kinetics of ^{14}C -labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its metabolites. *Environmental Research*. 109:225-231.
- Suojala, L.; Simojoki, H.; Mustonen, K.; Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (2010) Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 93: 1960–1969.
- Sumano, H. (1993) Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria Mexicana*, **24**, 284-288.
- Sundolf, S.F. & Whitlock, T.W. (1992) Clorsulon pharmacokinetics in sheep and goats following oral and intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **15**, 282-291.
- Tafur Garzón, M.A. (2000) Parmacocinética y residuos de marbofloxacin en pollos broiler. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Takizawa, T., Hasimoto, K., Itoh, N., Yamashita, S. & Owen, K. (1999) A comparative study of the repeat dose toxicity of grepafloxacin and a number of other fluoroquinolones in rats. *Human and Experimental Toxicology*, **18**, 38-45.
- Teng, R., Girard, D., Gootz, T.D., Foulds, G. & Liston, T.E. (1996) Pharmacokinetics of trovafloxacin (CP-99,219), a new quinolone, in rats, dogs and monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 561-566.
- Thomas, A. ; Nicolas, C. ; Dizier, I. ; Mainil, J. & Linden. A. (2003) Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium. *Veterinary Record*. 153 (14) : 428-431.
- Thomas, E., Gruet, P., Pommier, P. & Wessel-Roberts, S. (1998a) Maladies respiratoires des porcs charcutiers: Marbocyl 2 % *versus* amoxicilline. *Action Vétérinaire*, **1462** supp, 14-15.

- Thomas, E., Madelenat, A., Davot, J.L. & Boisrame, B. (1998b) Efficacité et innocuité comparées de la marbofloxacin et de l'oxytetracycline dans le traitement des maladies respiratoires des jeunes bovins. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **174**, 21-27.
- Thomas, E., Caldow, G.L., Borell, D. & Davot, J.L. (2001) A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* 24 : 535-358.
- Thomas, V., Deleforge, J. & Boisramé, B. (1994) Pharmacokinetics of marbofloxacin in preruminant and ruminant cattle. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)*, Edinburgo, 60.
- Thuong Guyot, M., Domarle, O., Pocidalo, J.J. & Hayem, G. (1994) Effects of fluoroquinolones in cultured articular chondrocytes flow cytometric analysis of free radical production. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **27**, 1544-1549.
- Tolls, J. (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science Technology*. 35: 3397-3406
- Traeder, W. (1996) Pharmacological behaviour, range of activity and efficacy of "Advocid 2,5 %" (danofloxacin mesylate solution), a new anti-infective agent of the fluoroquinolone group. *Tierärztliche Umschau*, **51**, 567-575.
- Trujillano Martín, Y., García Sánchez, E., Martínez, I.M., Fresnadillo, M.J., García Sánchez, J.E. & García Rodríguez, J.A. (1999) *In vitro* activity of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 194-195.
- Toutain, P.L., del Castillo, J.R & Bousquet-Melou, A. (2002) The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*. 73: 105-114.
- Toutain, P.L. & Bousquet-Melou, A. (2004) Plasma terminal half life. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27:427-439.
-

- Turnidge, J. (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*, **58** (suppl. 2), 29-36.
- United States Pharmacopoeia (2003) Veterinary Pharmaceutical Information Monographs – Antibiotics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 26 (Suppl. 2).
- Vancutsem, P.M., Babish, J.G. & Schwark, W.S. (1990) The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *The Cornell Veterinarian*, **80**, 173-186.
- Vancutsem, P.M. & Babish, J.G. (1996) *In vitro* and *in vivo* study of the effects of enrofloxacin on hepatic cytochrome P-450. Potential for drug interactions. *Veterinary and Human Toxicology*, **38**, 254-259.
- Van Boven, M.; Veldman, K.T.; de Jong, M.C. & Mevius, D.J. (2003) Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers. *Journal of Antimicrob. Chemother.* 52: 719-723.
- Van der Auwera, P., Stolear, J.C., George, B. & Dudley, M.N. (1990) Pharmacokinetics of enoxacin and its oxometbolite following intravenous administration to patients with different degrees of renal impairment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**, 1491-1497.
- Van der Hoven, R. (1997) A multi-centre observational study on the efficacy of Dicural R Palatabs R (difloxacin) for the treatment of canine cystitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 185-186.
- Van Miert, A.S.J.P.A.M. (1990) Influence of febrile disease on the pharmacokinetics of veterinary drugs. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **21** (suppl. 1), 11S-28S.
- Varma, R.; Ahmad, A.H.; Sharma, L.D.; Aggarwal, P. & Ahuja, V. (2003) Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration. *J.Vet.Pharmacol.Therap.* 26: 303-305.

- Villa, R., Prandini, E., Caloni, F. & Carli, S. (1997) Serum protein binding of some sulphonamides, quinolones and fluoroquinolones in farm and domestic animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 34.
- Vogelman, B. & Craig, W.A. (1986) Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics*, **108**, 835-840.
- Wallgren, P., Segall, T., Morner, A.P. & Gunnarsson, A. (1999) Experimental infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs - I. Comparison of five different parenteral antibiotic treatments. *Journal of Veterinary Medicine B*, **46**, 249-260.
- Walker, R.D. & Dowling, P.M. (2006) Fluoroquinolones. En: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. R. D. Walker. (Ed.) Iowa State University. Press, Ames. 263-284.
- Walker, R.D. (2000) The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal*. 78: 84-90.
- Walser, K., Gandorfer, B., Steinberger, A., Treitinger, E. & Winter, T. (1993) Studies on the antibacterial activity and pharmacokinetics of enrofloxacin (Baytril) in lactating cows. *Tierärztliche Umschau*, **48**, 414-416.
- Wang, Y.; Huang, W.M. & Taylor, D.E. (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37:457-463.
- Watanabe, T., Fujikawa, K., harada, S., Ohura, K., Sasaki, T. & Takayama, S. (1992) Reproductive toxicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin in rats and rabbits. *Arzneimittelforschung*, **43**, 374-377.
- Watson, A.D.J., Van Gogh, H., Van Deurzen, E.J.M., Van Duin, C.T.M. & Van Miert, A.S.J.P.A.M. (1987) Pharmacokinetics of three sulphonamides in ruminant and preruminant kids. *Research in Veterinary Science*, **43**, 208-216.
- Watt, B. & Brown, F.V. (1986) Is ciprofloxacin active against clinically important anaerobes?. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **17**, 605-613.

- Waxman, S., García Montijano, M., Sánchez, C., Ballesteros, C., San Andrés, M.I., González, F. & Rodríguez, C. (2000) Pharmacokinetic behaviour of marbofloxacin after oral administration in *Buteo buteo*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **23** (suppl. 1), B51.
- Waxman, S., Rodríguez, C.; González, F.; De Vicente, M.L.; San Andrés, M.I.; San Andrés, M.D. (2001) Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **24**: 375-378.
- Waxman, S., San Andrés, M.D., González, F.; San Andrés, M.I., De Lucas, J. & Rodríguez, C. (2004) Age-related changes in the pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **27**: 31-35.
- Waxman Dova, S., San Andrés, M.D., González, F.; San Andrés, M.I., De Lucas, J. & Rodríguez, C. (2007) Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin after subcutaneous administration in goats. *The Veterinary Journal*. **174**: 425-427
- Wetzstein, H.G. (2005). Comparative Mutant Prevention Concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones indicate differing potentials in preventing selection of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Oct. p 4166–4173.
- W.H.O. (1998) Use of Quinolones in Food and Potential Impact on Human Health. *Report and Proceedings of a WHO Meeting*. Geneva, Switzerland. 2-5 June 1998.
- Williams, P.D. & Helton, D.R. (1991) The proconvulsant activity of quinolone antibiotics in an animal model. *Toxicology Letters*, **58**, 23-28.
- Wolfson, J.S. & Hooper D.C. (1989) Introduction to DNA gyrase, quinolones and quinolone resistance. En *International telesymposium on quinolones*. 1ª edición. Ed. Fernandes, P.B. pp. 137-156. J.R. Prous, Barcelona.

- Wright, D.H.; Brown, G.H.; Peterson, M.L.; Rotschafer, J.C. (2000) Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46:669-683.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T. (1978) Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 6 (1978), pp. 165–175.
- Yoshida, H., Bogaki, M.; Nakamura, M. & Nakamura S. (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 34: 1271-1272.
- Yun, H.I., Park, S.C., Jun, M.H., Hur, W. & Oh, T.K. (1994) Ciprofloxacin in horses: antimicrobial activity, protein binding and pharmacokinetics. *Proceedings of the 6th International congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*, Edimburgo, pp. 28-29.
- Zeng, Z.L. & Fung, K. (1997) Effects of experimentally induced *Escherichia coli* infection on the pharmacokinetics of enrofloxacin in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **20** (suppl. 1), 39-40.
- Zanhel, G. (2001). Influence of pharmacokinetic and pharmacodynamic Principles on Antibiotic Selection. *Current Infectious Disease Report*. 3:29-34.
- Ziv, G. (1976) Clinical pharmacology of oxolinic acid in young dairy calves. *American Journal of Veterinary Research*, **37**, 513-516.
- Ziv, G. (1980) Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy -3: intramammary treatment. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*. 75: 657-670.
- Zlotos, G., Bucker, A., Kinzig Schippers, M., Sörgel, F. & Holzgrave, U. (1998) Plasma protein binding of gyrase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **87**, 215-220.

IX – ANEXOS

MARBOFLOXACINA: Determinación de CIM

CEPAS	CIM	DISCO mm
1) 123	0,5	25
2) 117	0,5	24
3) 131	0,5	25
4) 126	0,5	25
5) 108	0,5	28
6) 125	0,5	27
7) 107	0,5	26
8) 103	1	29
9) 127	0,5	28
10) 129	0,5	29
11) 136	0,5	25
12) 137	0,5	27
13) 135	0,5	25
14) 218	1	25
15) 134	1	25
16) 109	1	25
17) 100	0,5	25
18) 132	1	26
19) 133	0,5	26
20) 110	0,5	25
21) 106	0,5	27
22) 144	1	26
23) 200	0,5	29
24) 201	1	29
25) 202	0,5	26
ATCC	0,5	25

cepas	CIM	Disco mm
1) 295	0,5	26
2) 296	0,5	27
3) 297	0,5	27
4) 298	0,5	26
5) 299	0,5	25
6) 300	0,5	25
7) 302	0,5	24

8) 303	1	26
9) 304	0,5	26
10) 305	0,5	27
11) 306	0,5	28
12) 311	0,5	28
13) 312	0,5	28
14) 313	0,5	25
15) 314	1	27
16) 315	1	25
17) 316	0,5	27
18) 317	1	27
19) 318	0,5	29
20) 319	0,5	26
21) 320	1	25
22) 321	1	26
23) 322	0,5	24
24) 323	1	25
ATTC	0,5	26

cepas	CIM	Disco mm
1) 324	1	25
2) 325	1	27
3) 326	1	27
4) 327	1	28
5) 328	1	27
6) 329	1	28
7) 330	1	25
8) 331	0,5	26
9) 332	0,5	28
10) 261	0,5	27
11) 262	1	27
12) 263	1	25
13) 264	1	25
14) 288	0,5	25
15) 289	1	25
16) 336	1	25
17) 334	0,5	27
18) 333	1	25
19) 3	1	25
20) 18	1	30
21) 25	1	25
22) 43	1	26

23) 61	1	26
24) 120	1	26
25) 74	1	27
26) 149	1	26
27) 151	1	25
28) 152	1	25
29) 180	1	27
30) 168	1	28

ATCC

0,5

26 mm

cepas	CIM	Disco mm
1) 164	1	28
2) 161	0,5	27
3) 148	1	28
4) 142	1	28
5) 174	0,5	28
6) 154	1	27
7) 157	0,5	26
8) 160	1	26
9) 145	1	29
10) 158	1	26
11) 178	1	27
12) 240	1	28
13) 257	1	30
14) 228	1	29
15) 251	1	28
16) 226	0,5	28
17) 239	1	27
18) 245	1	28
19) 203	1	30
20) 205	0,5	25
21) 184	1	28
22) 291	1	28
23) 292	1	25
24) 293	1	24
25) 294	0,5	25

ATCC

1

27

cepas	CIM	Disco mm
1) 153	1	24
2) 169	0,25	24
3) 176	1	28
4) 206	0,5	27
5) 207	1	25
6) 208	0,5	27
7) 209	1	29
8) 210	0,5	29
9) 211	0,5	27
10) 212	0,5	31
11) 213	0,5	29
12) 214	1	26
13) 218	0,5	27
14) 222	1	26
15) 223	0,5	27
16) 227	0,5	26
17) 236	0,5	27
18) 237	0,5	28
19) 238	0,125	26
20) 242	1	25
21) 243	1	25
22) 248	1	26
23) 252	0,5	26
24) 253	0,5	27
25) 256	0,125	27
26) 258	1	28
27) 268	1	26
28) 269	1	27
29) 271	1	26
30) 364	1	26
ATCC	0,5	25

Caja 3 (3-4-07)

cepas	CIM	Disco mm
1) 337	0,5	27
2) 338	0,25	26

3) 340	0,25	27
4) 350	0,25	24
5) 353	0,25	28
6) 354	0,25	27
7) 349	0,25	26
8) 343	0,25	29
9) 351	0,25	27
10) 362	0,25	26
11) 365	0,25	25
12) 366	0,25	26
13) 367	0,25	
14) 368	0,25	
15) 372	1	
16) 373	0,25	
17) 374	0,25	
18) 377	0,25	
19) 385	0,25	
20) 386	0,25	
21) 380	0,25	
22) 381	0,25	
23) 382	0,25	

24) 383	0,25	
25) 384	0,25	
26) 387	0,25	
27) 388	0,25	
28) 380	0,25	
29) 389	0,25	
30) ATCC	0,25	